

**MIRYAN LANE SOARES NEGRI**

**SECAGEM DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA-SANTA – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E INFLUÊNCIA NOS TEORES DE POLIFENÓIS, NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima

CURITIBA  
2007

Dedico este trabalho aos meus filhos, por ordem de chegada, Camila, Ana Paula e Victor. Vocês chegaram para que a minha vida tivesse mais sentido.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus criador e mantenedor do Universo.

Ao meu esposo, Augusto pelo companheirismo e nossos filhos, Camila, Ana Paula e Victor pela compreensão de tantas mudanças em tão pouco tempo.

À minha mãe, Izaide e meus irmãos, Willyan e Ronize pelo apoio e força.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima, mais do que orientadora foi amiga constante.

À Universidade Estadual de Londrina pela concessão da licença para capacitação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Saúde pela oportunidade de enriquecer meus conhecimentos e conseguir novos amigos.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Farm. MSc. Kleber dos Santos Berté da empresa Chamel, pela disposição e ajuda.

Ao Sr. Estefano Dranka e funcionários por ter concedido sua empresa para a realização do trabalho, especialmente sua família pela acolhida.

Aos Prof. MSc. João Carlos Possamai pela colaboração tão preciosa.

Ao Prof. Dr. Edilberto Possamai pela concessão do aparelho sensor de termometria que possibilitou a realização de uma parte experimental na Indústria.

À Prof.<sup>a</sup> MSc. Luiza Efig da PUCPR pela colaboração e empréstimo de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo pela cessão de aparelhos de análise.

Ao Prof. MSc. Olavo A. Guimarães do Departamento de Botânica da UFPR pela identificação botânica da espécie.

Aos funcionários do TECPAR do Setor de Microbiologia, Carmen Etsuko Kataoka Higaskino, Isabel Cristina Figel, Alceu Peixoto e Siumara Costa da Cruz Almeida

À Hilda Aparecida dos Santos, funcionária do Laboratório de Fitoquímica e amiga muito querida.

Aos amigos Christian Boller, Maria das Graças de Toledo, Cláudia Andrade e Cláudia Bosheco.

Às colegas de curso Camila Klockner, Janaína Packer e Sílvia Mundo.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Regina Montrezol, pela disposição, sorriso e simpatia.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Dá-me, Senhor, na vida o termo médio  
Para que eu viva equilibradamente  
Que eu não me esquive a tudo indiferente,  
Nem a tudo me renda sem remédio.  
Dá que meu coração, sempre contente,  
Sorria e cante espadanando o tédio!  
Há nesta vida tanta, tanta gente  
Presa em grilhões de lúgubre epicédio!  
Veda-me o estulto gargalhar profano,  
O servilismo hipócrita e mesquinho  
E as atitudes bruscas de tirano.  
Que eu viva nobremente nesta vida  
Buscando sempre o centro do caminho  
Nunca pondo o meu juízo por medida.

Autor desconhecido.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS e SÍMBOLOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
3.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	3
3.2 ESPINHEIRA-SANTA.....	5
3.2.1 Aspectos Agronômicos.....	8
3.2.2 Substâncias Químicas.....	9
3.2.2.1 Substâncias fenólicas.....	10
3.2.2.1.1 Taninos.....	13
3.2.2.1.2 Flavonóides.....	15
3.2.3 Atividades Biológicas.....	17
3.3 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	20
3.5 SECAGEM.....	22
3.5.1 Princípios de Secagem.....	22
3.5.2 Conteúdo de Água nas Plantas e Secagem de Plantas Medicinais.....	24
3.5.3 Atividade de Água.....	28
3.5.4 Aspectos Microbiológicos.....	30
3.5.5 Secagem de Espinheira-santa .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	33
4.2 EQUIPAMENTOS.....	33

4.2.1	Balança Infravermelho Marca Top Ray BEL engineering – Infrared Moisture Balance.....	33
4.2.2	Espectrofotômetro UV-visible Shimadzu 1601.....	33
4.2.3	Detector de atividade de água.....	34
4.2.4	Estufa.....	34
4.2.5	Sensores de Temperatura.....	34
4.3	PROCESSO DE SECAGEM.....	35
4.4	AMOSTRAGEM.....	35
4.5	MEDIDAS DE TEMPERATURAS DE SECAGEM.....	36
4.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE NA PLANTA.....	36
4.6.1	Perda por Dessecação .....	36
4.6.2	Analisador de Umidade – Balança por Infravermelho.....	37
4.7	ATIVIDADE DE ÁGUA.....	37
4.8	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE POLIFENÓIS.....	37
4.8.1	Polifenóis Totais e Taninos.....	37
4.8.2	Taninos Totais, Fração Não-tanante e Fração Tanante .....	38
4.8.3	Flavonóides.....	38
4.9	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
4.9.1	Método fosfomolibdênio .....	39
4.9.2	Método DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	40
4.9.2.1	Determinação do IC <sub>50</sub> .....	41
4.9.2.2	Poder antiradical .....	41
4.10	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	41
4.10.1	Pré-tratamento da amostra.....	42
4.10.2	Contagem de microorganismos.....	42
4.10.2.1	Bactérias aeróbicas.....	42
4.10.2.2	Enterobactérias.....	42
4.10.2.3	<i>Escherichia coli</i> .....	42
4.10.2.4	Bolores e leveduras.....	43
4.10.3	Pesquisa de microorganismos.....	43
4.10.3.1	Enterobactérias.....	43
4.10.3.2	<i>Salmonella</i> sp.....	43

4.10.3.3 <i>Escherichia coli</i> .....	43
4.10.3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44
4.10.3.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
5.1 MEDIDAS DE TEMPERATURAS DE SECAGEM .....	45
5.2 TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM DA ESPINHEIRA-SANTA.....	48
5.3 ATIVIDADE DE ÁGUA.....	52
5.4 POLIFENÓIS .....	53
5.4.1 Polifenóis Totais e Taninos .....	53
5.4.2 Taninos Totais, Fração Não-tanante e Fração Tanante .....	55
5.4.3 Flavonóides.....	59
5.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	61
5.5.1 Método Fosfomolibdênio.....	61
5.5.2 Atividade Antioxidante pela Redução do DPPH.....	62
5.5.2.1 IC <sub>50</sub> das amostras e poder antiradical.....	63
5.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	64
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	FOLHAS E FRUTOS DE ESPINHEIRA-SANTA.....	7
FIGURA 2	ARBUSTO DE ESPINHEIRA-SANTA.....	7
FIGURA 3	ESTRUTURA QUÍMICA DOS TANINOS.....	14
FIGURA 4	ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES.....	16
FIGURA 5	REAÇÕES ENDÓGENAS DE FORMAÇÃO DE EROS.....	20
FIGURA 6	REAÇÃO DE REDUÇÃO DO DPPH* PELO ANTIOXIDANTE.....	22
FIGURA 7	CURVA TEÓRICA DE SECAGEM DE PLANTAS MEDICINAIS....	25
FIGURA 8	CURVAS DE EQUILÍBRIO NA SECAGEM E HIDRATAÇÃO EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA.....	29
FIGURA 9	DIAGRAMA DE ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA.....	30
FIGURA 10	MODELO DO SECADOR UTILIZADO NA SECAGEM DA ESPINHEIRA-SANTA.....	35
FIGURA 11	ESTRUTURA DE FLAVONÓIDES E HIDROXILAS QUE REAGEM COM $AlCl_3$ .....	39
FIGURA 12	MUDANÇA DE COLORAÇÃO NA REAÇÃO DE DPPH* COM ANTIOXIDANTE.....	40
FIGURA 13	TEMPO E CURVAS DE SECAGEM NAS DIFERENTES TEMPERATURAS.....	51
FIGURA 14	CURVA ANALÍTICA DE PIROGALOL.....	54
FIGURA 15	TEORES DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS PELO MÉTODO REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA (1981).....	55
FIGURA 16	CURVA ANALÍTICA DE QUERCETINA.....	60

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA SEGUNDO ENGLER E CRONQUIST.....	6
QUADRO 2	SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DA ESPINHEIRA-SANTA.....	11
QUADRO 3	TEORES DE POLIFENÓIS EM <i>M. ilicifolia</i> .....	12
QUADRO 4	LIMITES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM PLANTAS MEDICINAIS SEGUNDO OMS (WHO, 1998).....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ANÁLISE EM ESPECTROFOTÔMETRO E COMPRIMENTO DE ONDA CORRESPONDENTE.....	34
TABELA 2	TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 40 °C.....	45
TABELA 3	TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 50 °C.....	46
TABELA 4	TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 60 °C.....	46
TABELA 5	TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 70 °C.....	47
TABELA 6	TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 80 °C.....	47
TABELA 7	TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM - ROTINA.....	47
TABELA 8	TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 40 °C.....	48
TABELA 9	TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 50 °C.....	48
TABELA 10	TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 60 °C.....	49
TABELA 11	TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 70 °C.....	49
TABELA 12	TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 80 °C.....	49
TABELA 13	TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM DE ROTINA .....	50
TABELA 14	ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....	50
TABELA 15	ATIVIDADE DE ÁGUA E TEOR DE UMIDADE DA ESPINHEIRA-SANTA SECA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	53
TABELA 16	TEOR DE TANINOS TOTAIS PELA METODOLOGIA DA FB IV.....	57
TABELA 17	TEOR DE TANINOS NA ESPINHEIRA-SANTA PELA FB IV (2003) ....	58
TABELA 18	POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS SEGUNDO A FARMACOPÉIA ALEMÃ (DAB- 9).....	58
TABELA 19	COMPARAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS POR TRÊS REFERÊNCIAS DIFERENTES.....	59
TABELA 20	TEOR DE FLAVONÓIDES NA FOLHA DE ESPINHEIRA-SANTA SEGUNDO CÁLCULOS DA FB .....	61
TABELA 21	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	62
TABELA 22	IC <sub>50</sub> e PODER ANTIRADICAL DE EXTRATO DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA-SANTA.....	64
TABELA 23	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA NAS FOLHAS DE ESPINHEIRA-SANTA.....	65

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	-	Por cento
Aa	-	Atividade de água
AA	-	Ácido Ascórbico
Abs	-	Absorbância
ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACS	-	Ágar Caseína Soja
AP	-	Água peptonada
ara	-	Arabinose
B	-	Boro
BM	-	Banho-Maria
BP	-	Baird-Parker
BHI	-	Infusão cérebro e coração
Ca	-	Cálcio
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CENARGEN	-	Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos
Cl	-	Cloro
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
Co	-	Cobalto
Cu	-	Cobre
DP	-	Desvio Padrão
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC	-	<i>Escherichia coli</i>
EMATER	-	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMB	-	Eosina azul de metileno
ERN	-	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	-	Espécie reativa de oxigênio
FB	-	Farmacopéia Brasileira
Fe	-	Ferro
g	-	Gramma
gal	-	Galactose
glu	-	Glucose

GSH	-	Glutation
h	-	Hora
HDR	-	Hamamelidae, Dilleniidae e Rosidae
HIV	-	Vírus da imunodeficiência adquirida
HRGC-MS	-	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
IAL	-	Instituto Adolfo Lutz
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC <sub>50</sub>	-	Concentração para reduzir em 50% o DPPH
IMViC	-	Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato
K	-	Potássio
kg	-	Quilograma
m	-	Metro
M	-	Molar
mL	-	Mililitro
mg	-	Miligrama
Mg	-	Magnésio
Mn	-	Manganês
Mo	-	Molibdênio
N	-	Nitrogênio
nm	-	Nanômetro
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
P	-	Fósforo
pH	-	Potencial hidrogênio iônico
p/p	-	Peso/peso
PPO	-	Polifenol oxidase
Pv	-	Pressão de vapor de água num sólido
Pvo	-	Pressão de vapor de água pura
ram	-	Ramnose
S	-	Enxofre
SM	-	Solução Mãe
SS	-	<i>Salmonella/Shigella</i>

ton	-	Tonelada
ufc	-	Unidade formadora de colônia
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
URE	-	Umidade relativa de equilíbrio
U\$	-	Dólar
UV	-	Ultravioleta
W	-	Watts
XLD	-	Xilose, Lisina, Desoxicolato
Zn	-	Zinco
µg	-	Micrograma

## RESUMO

A espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, Celastraceae, planta nativa da região sul do Brasil apresenta propriedades antiulcerogênicas comprovadas. As atividades biológicas estão ligadas às substâncias químicas que apresenta, os triterpenos e os polifenóis (taninos e flavonóides). A ação farmacológica vai depender dos teores de princípios ativos da planta que podem variar por diversos fatores, como composição do solo, local de plantio, técnica de colheita e processamento pós-colheita, dentre eles, a secagem da planta. Durante a secagem, o tempo, a temperatura empregada e a quantidade de umidade residual podem determinar alterações nos polifenóis, na carga microbiana e na atividade antioxidante da planta. Neste trabalho foram avaliadas as alterações decorrentes do processo de secagem na qualidade final da planta para uso como infusão ou para uso interno. Foram avaliados parâmetros de qualidade nas folhas de espinheira-santa seca em temperaturas que variaram de 40 °C a 80 °C e na secagem de rotina de um produtor de plantas medicinais, como teores de umidade final, de polifenóis totais, de taninos e de flavonóides, atividade antioxidante, atividade de água e contaminação microbiológica. Os resultados mostraram que houve diminuição praticamente em todos os teores avaliados quando ocorreu aumento da temperatura de secagem. A qualidade microbiológica das plantas não mostrou correlação com as temperaturas de secagem, sendo as baixas temperaturas as indicadas a espinheira-santa. Verificou-se nesse experimento que a temperatura de secagem exerce influência nos teores de polifenóis e atividade antioxidante; sendo aconselhável utilizar a temperatura de 40 °C para o processo de secagem evitando diminuição dos princípios ativos.

Palavras-chaves: *Maytenus ilicifolia*, espinheira-santa, secagem, polifenóis, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

The espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, Celastraceae, native plant of Brazilian south has properties antiulcerogenics comprovated. The biological activities corresponding chemical substances like triterpenes and polyphenols (tannins and flavonoids). The pharmacology action depends of the graduation of active principal on the plant and which can range for enviromental factors, like soil composition, plant local, harvested techniques and pos-harvested process, among plant drying. During drying, the time, the temperature used and concentration of humidity residual can make changes in polyphenols, in the microbiological charge and in antioxidant activity of the plant. In this work were evaluated changes about the drying process in the final quality of the plant for infusion use or for internal use. Were evaluated quality parameters in the leaves of espinheira-santa dry in temperatures about 40 °C to 80 °C and in drying routine of a producer of medicinal plants, as humidity final concentration, of total polyphenols, tannins and flavonoids, antioxidant activity, water activity and microbiological contamination. The results showed a decreased in almost all content evaluated when the drying temperature was increased. The microbiological quality of the plants doesn't show relationship with the drying temperature, with the low temperatures the indicated for the espinheira-santa. In this research the drying temperatures make differences in the polyphenols concentration and in the antioxidant activity; being advisable use the temperature of 40 °C to the drying process to avoid decreasing of active principals.

Key-words: *Maytenus ilicifolia*, espinheira-santa, drying, poliphenols, antioxidant activity.



## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são riquíssimas em substâncias químicas, formando os fitocomplexos, que são misturas responsáveis pelas atividades biológicas (MARQUES, 2005). Elas produzem as substâncias químicas a partir dos nutrientes, da água e da luz que recebem, sintetizam os metabólitos primários para as próprias necessidades e os metabólitos secundários, para a adaptação ao meio, como defesa e proteção contra radiação UV. Do resultado do metabolismo primário, um açúcar, inicia-se o metabolismo secundário, dessa forma este se encontra fortemente influenciado pelo primeiro (SIMÕES et al., 2004). Os metabólitos secundários que apresentam atividade biológica são conhecidos como princípios ativos e têm despertado o interesse para um mercado promissor pela descoberta das atividades terapêuticas. As alterações no estado nutricional, variações sazonais, luz e a umidade vão ter influência na produção dos compostos secundários. Além desses fatores, a qualidade e a quantidade de princípios ativos são influenciadas pelo sistema de cultivo ou coleta (extrativismo) e, pelas atividades pós-colheita, como a secagem, o transporte, a manipulação e o armazenamento da planta. Logo após a colheita o material coletado deve passar pelo processo de secagem, a fim de retirar a água e impedir as reações de hidrólise e o crescimento de microorganismos. A OMS - Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003) recomenda que as plantas medicinais sejam secas em temperaturas inferiores a 60 °C evitando a perda de material volátil e degradação de princípios ativos, porém, segundo alguns autores (CORRÊA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994; REIS e SILVA, 2004) a temperatura máxima para a secagem é de 40 °C. Temperatura de 80 °C foi recomendada para a secagem de camomila (BORSATO, 2003). As controvérsias existem quanto ao processo e neste contexto, estão os agricultores ou beneficiadores das plantas medicinais que realizam a secagem, muitas vezes em temperaturas sem o controle devido ou na temperatura inadequada ao princípio ativo. Estabelecer as temperaturas de secagem e a influência no teor dos princípios ativos é um trabalho relevante, pois o estudo e a compreensão desse processo vêm contribuir para melhoria da qualidade do produto final, seja para consumo ou como intermediário na produção de medicamentos fitoterápicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o processo de secagem de folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae, sob diferentes temperaturas, monitorando a umidade residual durante o processo e analisar a influência da temperatura de secagem nos teores de polifenóis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a umidade residual nas folhas de espinheira-santa durante a secagem em diferentes temperaturas.
- Avaliar o processo de secagem das folhas de espinheira-santa, em escala agroindustrial, quanto ao tempo de secagem e a qualidade da droga vegetal.
- Construir curvas de secagem para as diferentes temperaturas.
- Verificar a influência das diferentes temperaturas de secagem nos teores de polifenóis totais, taninos e flavonóides e sugerir uma temperatura de secagem ideal.
- Acompanhar e comparar o processo de secagem realizado na rotina de um produtor e as secagens em temperaturas controladas.
- Efetuar as análises físico-químicas e microbiológicas após diferentes temperaturas de secagem.
- Realizar análise da atividade antioxidante para o extrato das folhas de espinheira-santa seca em diferentes temperaturas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é uma prática comum, a qual tem sido transmitida de geração a geração. O interesse por plantas medicinais tem aumentado tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. O motivo deve-se ao retorno aos hábitos de vida saudável e natural, aos efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos normalmente apresentam, às pesquisas crescentes na área de plantas medicinais com descobertas de novos princípios ativos e o preço que na maioria dos casos é mais baixo que os medicamentos convencionais (SILVA et al., 2005).

O mercado mundial de medicamentos movimenta aproximadamente U\$ 300 bilhões/ano, onde desse valor estima-se que U\$ 20 bilhões sejam derivados de plantas medicinais e o crescimento do mercado mundial de fitoterápicos está estimado em 10 a 20% ao ano (SOUSA e MIRANDA, 2005). A Alemanha desempenha uma grande importância, somente ela movimenta em torno de 50% do mercado europeu e 20% do mercado mundial (MARQUES, 2005). Dentro desse contexto o Brasil está numa posição privilegiada, pois se constitui em um dos países com a maior biodiversidade do planeta e pode tornar-se um importante provedor de recurso farmacológico derivado da flora (SILVA et al., 2005).

Atualmente se observam certos avanços no comércio e no desenvolvimento de legislações relacionadas com a fitoterapia, mesmo assim, seus produtos ainda são extraídos, comercializados e utilizados em grandes quantidades sem suficiente conhecimento sobre sua origem e destino; ainda faltam estudos clínicos comprovando a eficácia e a segurança dos princípios ativos para validá-los como medicamentos ou aproveitá-los economicamente. A baixa qualidade e padronização dos produtos comercializados, além do uso de espécies erradas, da adulteração, contaminação com substância tóxica, superdosagens, uso indevido e interação com medicamentos têm levado as autoridades sanitárias a preocuparem-se com a segurança, eficácia e qualidade das drogas vegetais. As informações de como realizar o manejo, comércio e conservação adequados para as plantas medicinais ainda estão inacessíveis ao agricultor (SILVA et al., 2005); em razão disso, países

estão se mobilizando para elaboração de normas e guias de boas práticas agrícolas para plantas medicinais. A China, Japão e União Européia já possuem documentos visando padronizar os procedimentos no cultivo, coleta e pós-colheita de plantas medicinais (WHO, 2003). A OMS (WHO, 2003) recomenda que os procedimentos de cultivo, de colheita e de pós-colheita sejam escritos e seguidos pelos operadores, padronizando o processo. É importante que os manipuladores sejam treinados e que as condições ambientais, higiênicas e sanitárias sejam estritamente seguidas.

Para a nutrição, a planta retira do ar e da água o oxigênio, o hidrogênio e o carbono, e mais catorze nutrientes são retirados do solo pela raiz. Os nutrientes retirados do solo dividem-se em macro e micronutrientes. Os macronutrientes são N, P, K, Ca, Mg e S e os micronutrientes como o B, Cl, Cu, Co, Fe, Mn, Mo e Zn são importantes como integrantes de enzimas, porém, em excesso são prejudiciais à planta (RADOMSKI, 1998). Quando se faz uso de máquinas e em excesso de revolvimento do solo ocorre prejuízo para a fertilidade, com morte de microorganismos e modificação da estrutura normal, por isso recomenda-se o preparo do solo pelo cultivo mínimo. Uma boa adubação confere à planta mais resistência a pragas e doenças e por vezes aumenta a produção de metabólitos secundários. Na adubação do solo é preferível usar adubo orgânico aos químicos pela melhor retenção de água.

As espécies medicinais apresentam metabolismo secundário produzindo substâncias químicas com função de proteção ao ataque de pragas e doenças. Estas substâncias que são nocivas a alguns níveis de organismos podem apresentar atividades terapêuticas a outros e às vezes a relação tóxico/terapêutica depende apenas da dose (MAGALHÃES, 1997).

CORRÊA JUNIOR, MING e SCHEFFER (1994) descrevem as influências climáticas, como temperatura, luminosidade, umidade, altitude e latitude, sobre a produção das substâncias ativas, podendo haver aumento ou diminuição dos seus teores. Um bom indicador da qualidade das plantas medicinais é o teor de princípio ativo, que por sua vez é influenciado pela época de colheita, pelo manuseio correto durante e após a colheita, pelo beneficiamento adequado e pela armazenagem apropriada. São descritas as seguintes recomendações para as plantas medicinais (BRITO et al., 1999; CORRÊA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994; SCHEFFER, 2002):

✓ A época de colheita deve ser determinada quando ocorre produção máxima de ativos, que varia segundo o órgão da planta, estágio de desenvolvimento, época do ano e hora do dia. A colheita deve ser feita com tempo seco, sem água sobre as folhas e talos, após a secagem do orvalho. Evitar colheita após longo tempo de chuva, pela diminuição do teor de ativos e favorecimento da contaminação por fungos.

✓ O manuseio correto na colheita preserva a integridade das partes colhidas minimizando as perdas. Os coletores devem fazer uso de ferramentas apropriadas, bem limpas após o corte, evitando que resíduos de uma planta contaminem outra, não devem misturar partes indesejáveis nem machucar a planta. O material coletado deve ser depositado em cestos e caixas sem ser esmagados causando degradação e perda da qualidade. Evitar colheita de plantas doentes ou manchadas, com resíduos de terra e com os órgãos deformados. Deve-se evitar a incidência de raios solares sobre o material coletado.

✓ Após a colheita, transportar o material protegido do sol e no menor tempo para a secagem. Procurar armazenar o menor tempo possível evitando perda de princípios ativos. O local de secagem deve ser seco, ao abrigo da luz, arejado, livre de insetos, roedores, fungos, traças, poeira ou material estranho. Se necessário a descontaminação, realizar com o local vazio. Embalar cada planta separadamente, identificada com nome da espécie, parte colhida, data da colheita, data da secagem e nome do produtor. Geralmente usam-se embalagens de polietileno e desaconselha-se a sua reutilização. Após o acondicionamento, as embalagens devem ser colocadas sobre estrados e não diretamente no chão. As plantas aromáticas devem ser mantidas separadas.

### 3.2 ESPINHEIRA-SANTA

*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., família Celastraceae, recebeu o nome popular de espinheira-santa pela aparência das folhas, as quais possuem as bordas com espinhos e pelas propriedades medicinais (MAGALHÃES, 2005). O nome do gênero *Maytenus* vem de Maytén, nome de uma planta utilizada pelos Mapuches, no Chile. A denominação *ilicifolia* significa “o que tem folhas iguais ao *Ilex*” que é um azevinho usado como enfeite de Natal, do mesmo gênero que pertence a erva-mate

(REIS e SILVA, 2004). O gênero *Maytenus* conta com 200 espécies tropicais, sendo que a América do Sul dispõe do maior número delas. Destas, 40% ou aproximadamente 76 espécies e 14 variedades ocorrem no Brasil, destacando na flora nacional *M. ilicifolia*. O quadro 1 descreve a classificação taxonômica da espinheira-santa verdadeira segundo Engler e Cronquist.

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA SEGUNDO ENGLER E CRONQUIST

Táxon	Engler (Engler, 1964)	Cronquist (Cronquist, 1988)
Divisão	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Archichlamydeae	Rosidae
Ordem	Celastrales	Celastrales
Família	Celastraceae	Celastraceae
Gênero	<i>Maytenus</i>	<i>Maytenus</i>
Espécie	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Maytenus ilicifolia</i>

Os nomes populares são: cancerosa, cancoroso, cancrosa, congora, coromilho-do-campo, erva-cancerosa, espinheira-santa, espinheira-divina, espinho-de-Deus, limãozinho, maiteno, pau-josé, salva-vidas e sombra-de-touro (CORRÊA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994).

*M. ilicifolia* é encontrada principalmente na região sul do Brasil e nos países vizinhos, Paraguai, Uruguai e Leste da Argentina, com ocorrência também no estado de Mato Grosso do Sul e São Paulo, no interior de mata nativa e mata ciliar, onde o solo é rico em matéria orgânica e bem drenada, em altitude de até 1.200 m. É uma planta de clima temperado e subtropical, com umidade média a alta (RADOMSKI, 1998; CORRÊA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994). O cultivo da planta no estado do Paraná concentra-se nas regiões de Curitiba, Guarapuava e Irati (SCHEFFER, CORRÊA JUNIOR e GRAÇA, 2004).

*Maytenus ilicifolia* é uma espécie arbórea-arbustiva, geralmente com 5 m de altura. Apresenta caule liso e inserção das folhas helicoidal, o que a distingue de *M. aquifolium* que apresenta caule e ramos com estrias longitudinais e inserção das folhas pareada (MAGALHÃES, 1997). As folhas são simples, alternadas e

lanceoladas com cristais de oxalato de cálcio nas células epidermais e camada de cutícula espessa (DUARTE e DEBUR, 2005).

FIGURA 1 - FOLHAS E FRUTOS DE ESPINHEIRA-SANTA



FONTE: NEGRI, 2006. Araucária, Paraná, Brasil.

FIGURA 2 - ARBUSTO DE ESPINHEIRA-SANTA



FONTE: NEGRI, 2006. Araucária, Paraná, Brasil.

Estima-se que cerca de 40% das plantas comercializadas como *M. ilicifolia* sejam na verdade de outras espécies (SCHEFFER, CORRÊA JUNIOR e GRAÇA, 2004), mas a maior demanda hoje é por folhas de *Maytenus ilicifolia*, considerada a verdadeira (REIS e SILVA, 2004). Pela semelhança das folhas, outras espécies são adicionadas como adulterantes, por exemplo, a *Sorocea bomplandii* (Baill.) Burger, *Zollernia ilicifolia* Vog. e *M. aquifolium*. Em oito amostras de fitoterápicos à base de espinheira-santa submetida à CCD (cromatografia em camada delgada) apenas três amostras revelaram a presença de marcadores químicos de *Maytenus ilicifolia* e somente uma das amostras revelou ausência de marcadores químicos considerados adulterantes (ALBERTON, FALKENBERG e FALKENBERG, 2002; ALBERTON et al., 2002).

### 3.2.1 Aspectos Agronômicos

*Maytenus ilicifolia* apresenta boa capacidade adaptativa, apesar de o habitat natural ser em ambientes sombreados, o cultivo a pleno sol ou em consorciação com outras espécies fornecendo sombra parcial é possível. A pleno sol aumenta a quantidade de taninos, de polifenóis totais e de polifenóis não tanantes, o tamanho da folha é menor, mais coriáceas e com espinhos maiores, rebrotam melhor depois de podadas, florescem e frutificam mais. Apresenta resistência à geadas e responde favoravelmente a adubação e irrigação (RADOMSKI, 1998).

Acredita-se que 95% da coleta de espinheira-santa ainda sejam obtidas por extrativismo, que por ser ilegal e sem controle sanitário, o produto que chega ao consumidor normalmente não atende às especificações exigidas. Na reunião técnica “Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais”, promovida pelo IBAMA e CENARGEN em Brasília (2001), a espinheira-santa foi considerada prioritária para o desenvolvimento de trabalhos de manejo e conservação por causa da crescente demanda de utilização e pelo extrativismo. Em função do extrativismo é considerada espécie ameaçada de extinção, tornando-se necessário sair do sistema de extrativismo e solidificar o sistema de domesticação e cultivo (REIS e SILVA, 2004).

O cultivo de espinheira-santa deve ser preferentemente orgânico e a propagação pode ser por semente, estaquia ou cultura de tecidos (MAGALHÃES,



1997). A cultura de gemas e meristemas é o método mais rápido, eficiente e confiável dos métodos de micropropagação (FLORES et al., 1998), porém a propagação normalmente é por sementes, com a vantagem de permitir a produção em grande escala e formação de raiz pivotante.

Normalmente, não tem sido observada ocorrência de pragas em culturas de espinheira-santa, porém cochonilhas, ácaros e pulgões são relatados e causam a dobra das folhas (CIRIO et al., 2003).

O florescimento começa no início da primavera e permanece durante o verão. A frutificação se dá nos meses de novembro a janeiro ou dezembro a fevereiro, em maior pluviosidade. A colheita é realizada no sexto ano, na primavera ou verão, através de poda. Colhem-se ramos e folhas juntos, mantendo-as juntas na secagem (REIS e SILVA, 2004).

O armazenamento deve ser por um período de um ano, em local escuro, seco e ventilado. Dispor sobre estrados ou prateleiras. A embalagem não deve permitir passagem de luz, nem contato com o ar externo, porém observou-se que os espinhos das folhas secas conseguiam perfurar a embalagem de polietileno. Para períodos curtos de armazenagem, pode ser usado sacos de juta, de nylon trançado, sacos de papel kraft forrados com plástico (REIS e SILVA, 2004).

O comércio de espinheira-santa atualmente é de 160 ton/ano, porém desse montante, aproximadamente 40% é de outras espécies, tidas como adulterantes. No Programa “Paraná 12 meses”, da EMATER-PR e UFPR foram recolhidas amostras para avaliar a qualidade das plantas medicinais produzidas no estado. Os laudos apontaram que 80% das amostras estavam abaixo do padrão exigido (REIS e SILVA, 2004).

### 3.2.2 Substâncias Químicas

As plantas, ao contrário dos animais, conseguem sintetizar substâncias químicas para o próprio sustento. Algumas destas substâncias sofrem sucessivas transformações produzindo os metabólitos secundários. Destes, a maioria apresenta atividade farmacológica e são denominados de princípios ativos. Os metabólitos secundários podem estar armazenados em diferentes locais e órgãos na planta e a sua ação biológica pode acontecer com a substância química isolada ou em

associação. Os fitocomplexos, que são substâncias químicas que agem associadamente para a ação biológica, podem atuar também melhorando a estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e diminuir os efeitos colaterais ou

aumentar a ação farmacológica da planta, se comparado à substância química isolada (FONTE, 2004).

Na espinheira-santa foram isoladas várias substâncias químicas, onde as mais citadas são os taninos, os flavonóides e os triterpenos (CORDEIRO, VILEGAS e LANÇAS, 1999). Na tabela 1 encontra-se descrita a relação das substâncias químicas isoladas e identificadas.

As plantas medicinais freqüentemente apresentam diferenças químicas sazonais, afetando a produção de princípios ativos nas diferentes épocas do ano. Análises realizadas em folhas de *Maytenus aquifolium* nas quatro estações do ano revelaram que na primavera o teor de flavonóides e fenóis totais foram maiores, enquanto que para os triterpenos o maior teor ocorreu no inverno, sendo que a proporção de friedelan-3-ol para a friedelina foi de 5:1 (YARIWAKE et al., 2005).

Algumas espécies de espinheira-santa apresentam os triterpenos quinonametídeos nas raízes, com potencial tóxico (NOSSAK et al., 2004).

#### 3.2.2.1 Substâncias fenólicas

As substâncias fenólicas possuem pelo menos um anel aromático ligado a um grupamento hidroxila. Estão distribuídos amplamente no reino vegetal, porém os animais são praticamente incapazes de sintetizar o anel aromático. São derivados metabolicamente do ácido chiquímico e fenilpropanóides (ROBARDS et al., 1999). A maioria das substâncias fenólicas não é encontrada na natureza na forma livre, mas como ésteres ou heterosídeos. Nas plantas, encontram-se armazenados nos vacúolos, no estado reduzido ou frequentemente como heterosídeos, que não são tóxicos às plantas (BECKMAN, 2000), porém no corte ou esmagamento da planta que normalmente ocorre durante a colheita, os polifenóis são oxidados pela PPO (polifenol oxidase) a quinonas dando coloração escura. Se as quinonas se ligarem aos aminoácidos contendo S ou N há formação de complexos quinona-aminoácido alterando cor, aroma e sabor da planta (BITTNER, 2006).

QUADRO 2 - SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ENCONTRADAS NA ESPINHEIRA-SANTA

PARTE PLANTA	CLASSE	SUBSTÂNCIA QUÍMICA	REFERÊNCIA
Folhas	Glucosídeos	Ilicifolinosídeo A,B e C	ZHU, SHARAPIN e ZHANG (1998)
Folhas	Flavonóides heterosídicos/taninos	Flavonóis luteolínicos/apigenínicos Taninos condensados	XAVIER e D'ANGELO (1996)
Folhas	Flavonóides heterosídicos	Canferol-3-gal-ram Canferol-3- gal-di(ram) Canferol-3-gal-di(ram)-glu Canferol-3-gal-di(ram)-ara Quercetina-3-gal-di(ram) Quercetina-3-gal-di(ram)-glu	LEITE et al. (2001)
Folhas	Flavonóides heterosídicos	Canferol-3-hexose Canferol-3- ramno-hexose Canferol-3-di-(ramno)-hexose Canferol-3-pentose-ramnose Hiperosídeo(quercetina-3-Gal) Isoquercetrina(quercetina-3-Glu) Quercetina-3-ramno-hexose Quercetina-3-di-(ramno)-hexose Quercetrina(quercetina-3-ramnose) Rutina (quercetina-3-Glu-ram)	TIBERTI et al. (2006)
Folhas	Taninos	Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (Procianidina B <sub>1</sub> ) Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (Procianidina B <sub>2</sub> )	PESSUTO (2006)
Folhas	Substâncias voláteis e semi-voláteis	Estigmasterol, esqualeno, vitamina E, fitol, ácido dodecanóico, acetato geranila	MOSSI et al. (2004)
Folhas	Triterpenos	friedelan-3-ol e friedelina	YARIWAKE et al. (2005)
Raiz	Triterpenos	cangoronina e ilicifolina	ITOKAWA et al. (1991)
Raiz	Triterpenos quinonametídeos	maitenina e pristimerina	NOSSAK et al. (2004)
Raiz	Sesquiterpenos	Poliéster sesquiterpenos oligo-nicotinados	ITOKAWA et al. (1993)

Segundo DUARTE e DEBUR (2005), na espinheira-santa as substâncias fenólicas são encontradas no mesofilo, predominantemente no segundo extrato paliádico. São normalmente ácidas, altamente reativos, formam pontes de hidrogênio intra e intermolecular, ligando-se a proteínas e complexando-se com metais (SIMÕES et al., 2004). Pela aromaticidade são absorvidas intensamente na região UV e nas plantas estão relacionados à proteção contra aumentos de luminosidade, sendo que os raios UV ativam a enzima fenilalanina amônia-liase e estimulam a produção epidérmica dos fenóis (NICHOLS-ORIAN<sup>1</sup> citado por RADOMSKI, 1998). Espécies produzidas em habitats pobres contêm maior quantidade de defesas fenólicas, podendo ser um mecanismo de defesa.

As substâncias fenólicas são encontradas principalmente como polifenóis e estão presentes em várias classes de metabólitos secundários, como os taninos e os flavonóides e são facilmente oxidáveis por enzimas, metais, luz e calor (SIMÕES et al., 2004). A composição fenólica é determinada genética e ambientalmente, porém o processamento e o armazenamento podem modificar os teores por reações oxidativas, principalmente nas frutas.

As reações mais importantes que ocorrem nos polifenóis estão relacionadas com o potencial redox, mais especificamente a atividade antioxidante e o escurecimento oxidativo (ROBARDS et al., 1999).

MARTINS et al. (2003) encontraram nas folhas de *Maytenus ilicifolia*, 8,72; 5,61 e 3,11 g% de polifenóis totais, polifenóis não-tanantes e taninos totais, respectivamente e RADOMSKI (1998) os valores relatados no quadro 3 para os ramos e folhas de *M. ilicifolia* cultivadas a pleno sol e à sombra.

QUADRO 3 - TEORES DE POLIFENÓIS EM *M. ilicifolia*

Sistema de cultivo	Polifenóis totais (%)	Polifenóis não tanantes (%)	Taninos (%)
Folhas a pelo sol	10,3	2,2	8,1
Ramos a pleno sol	6,6	1,9	4,7
Folhas à sombra	7,9	1,7	6,2

<sup>1</sup> NICHOLS-ORIAN, C.M. Environmentally induced differences in plant traits: consequences for susceptibility to a leaf-cutter ant. **Ecology**, v.72, n.5, p.1609-1623, 1991.

Os usos das substâncias fenólicas são variados, na indústria alimentícia e farmacêutica como flavorizante, corante, aromatizante e principalmente como antioxidante (SIMÕES et al., 2004).

#### 3.2.2.1.1 Taninos

Os taninos são polifenóis encontrados em plantas superiores e têm sido utilizados desde muito tempo no curtimento de couro (SIMÕES et al., 2004). Apresentam a propriedade de formar complexos insolúveis com alcalóides, gelatina e outras proteínas (HAGERMAN, 2006; HASLAM, 1996), onde nas proteínas as principais forças de ligação são as interações hidrofóbicas e as pontes de hidrogênio. As proteínas que contêm aminoácido prolina (proteínas salivares, caseína, colágeno e bradicinina) são as que se ligam mais fortemente aos taninos; no caso das proteínas salivares, a adstringência de certos frutos e vegetais é decorrente dessa complexação. Proteínas pequenas e de conformação bastante compactada apresentam baixa afinidade pelos taninos (HASLAM, 1996). Nas plantas os taninos exercem função de proteção contra os herbívoros e ataques de insetos, fungos e bactérias (MADHAN et al., 2005). BECKMAN (2000) verificou que os taninos são compartimentalizados dentro dos vacúolos nas células vegetais na forma não polimerizada ou condensada, como *o*-diidroxifenóis (3-hidroxitiramina ou dopamina) e quando necessário, são rapidamente oxidados e polimerizados.

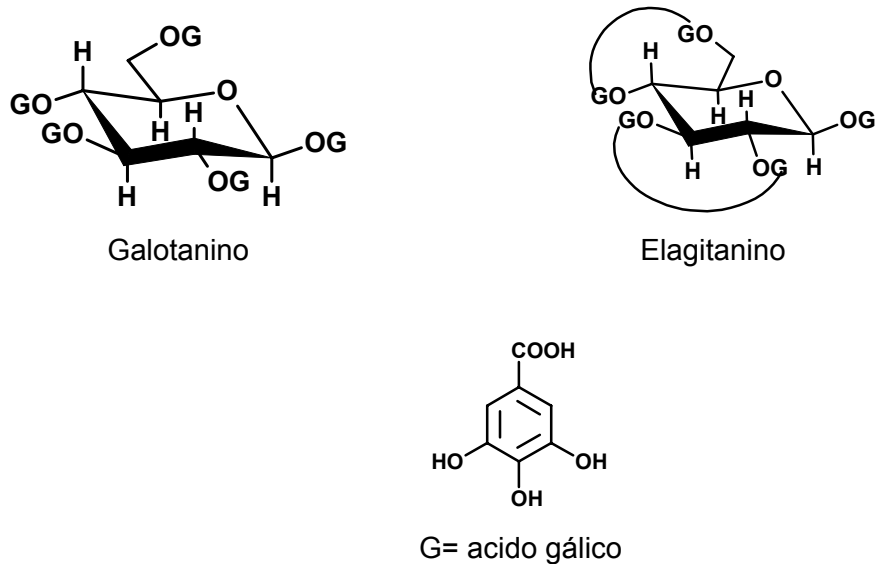
A classificação dos taninos está baseada nas características estruturais e propriedades químicas (KHANBABAEE e REE, 2001) e dividem-se em dois grupos principais (HAGERMAN, 2006; BHAT et al., 1998): taninos hidrolisáveis, formados por éster de ácido gálico e seus derivados (galotaninos, elagitaninos) e os taninos condensados (proantocianidinas poliméricas ou oligoméricas com diferentes acoplamentos de unidades flavônicas) (Fig.3).

A atividade biológica dos taninos tem relação com o tamanho das moléculas, ou seja, a polimerização que sofrem; por exemplo, alguns taninos hidrolisáveis apresentam maior atividade anti-HIV em moléculas grandes e o aumento do número de grupamentos galoil proporciona uma maior complexação com as proteínas. Os elagitaninos estão amplamente distribuídos nas subclasses

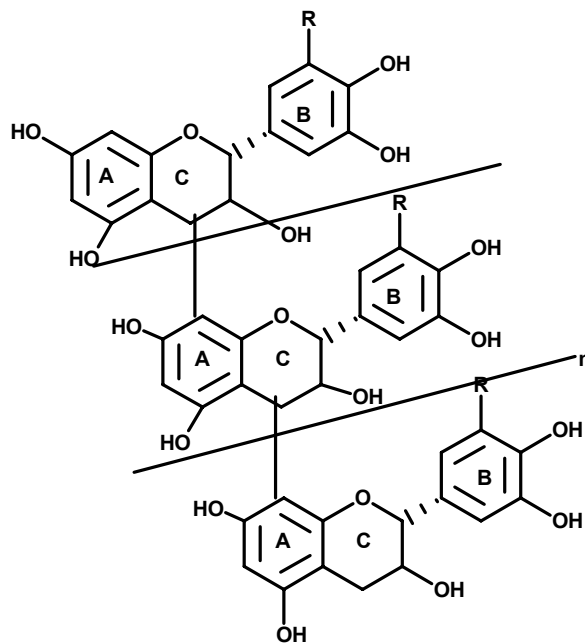
HDR (Hamamelidae, Dilleniidae e Rosidae), por esse motivo são usados como marcadores taxonômicos (HASLAM, 1996).

FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS TANINOS

Taninos hidrolisáveis



Taninos condensados



R: H – Catequinas e epicatequinas  
 R: OH – galocatequinas e epigalocatequinas  
 FONTE: KHANBABAEE e REE (2001)

Os taninos condensados são estruturas flavan-3-ol (catequinas) polimerizadas, e quando ligadas ao colágeno tipo I formam estruturas altamente estáveis, podendo ter diversas aplicações como material biocompatível (MADHAN et al., 2005). Estudo em plasma e urina humana mostrou que a ingestão de chá verde contendo catequinas resultou em derivado metabólico metilado em posição 3' para catequinas e epicatequinas e metilado em posição 4' para epigallocatequinas preferentemente (MENG et al., 2001).

A luminosidade é um fator que afeta a produção de taninos, sendo diminuída em ambientes sombreados comparados a espécies cultivadas ao sol. Observou-se também que, quanto mais velha a planta, maior a concentração de taninos (SCHEFFER, 2002).

As atividades farmacológicas dos taninos são atribuídas a três ações (SIMÕES et al., 2004):

- ✓ Complexação com íons metálicos
- ✓ Atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres
- ✓ Complexação com macromoléculas: proteínas e polissacarídeos.

Os usos dos taninos são diversos, já foram identificadas atividades bactericidas, fungicidas, antiviral, moluscicida, inibição de enzimas, de peroxidação lipídica, seqüestradora de radicais livres e antitumoral. Alguns taninos mostraram capacidade de inibir seletivamente a replicação do vírus HIV (KANBABAEE e REE, 2001). Na indústria os taninos são usados no curtimento de couro, produção de vários tipos de polímeros, preservação de madeiras, entre outros (SIMÕES et al., 2004).

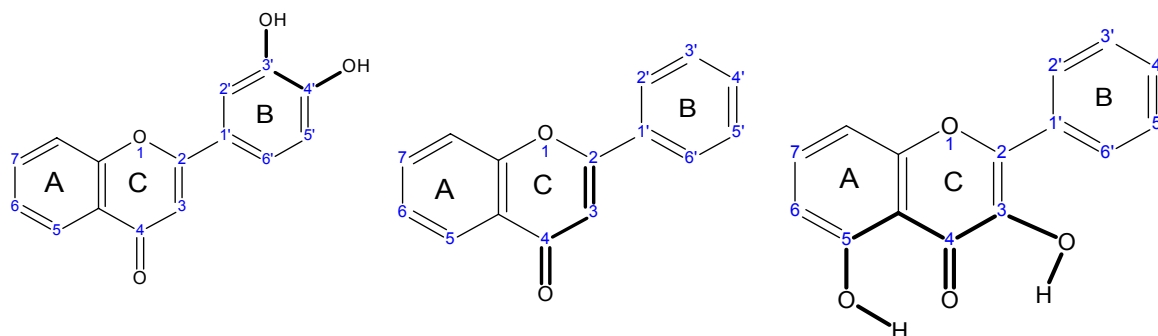
Na espinheira-santa foram detectados taninos condensados (JORGE et al., 2004; PESSUTO, 2006).

#### 3.2.2.1.2 Flavonóides

Os flavonóides são grupos polifenólicos complexos com estrutura comum contendo dois anéis aromáticos (A e B) e um anel aromático heterocíclico oxigenado (C), é um dos grupos fenólicos mais importantes de origem natural. Fazem parte dos flavonóides cerca de 4 mil substâncias, incluindo os flavanóis, as flavanonas, as

flavonas, os flavonóis e as antocianidinas (WILLELM FILHO, SILVA e BOVERIS, 2001). São biossintetizados via combinação do ácido chiquímico e poliacilmalato.

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES



FONTE: WILLELM FILHO, SILVA e BOVERIS (2001).

NOTA: em negrito, os elementos estruturais para a atividade antioxidante.

São relatados usos na proteção contra radiação UV e visível, proteção aos ataques de insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de polinizadores, propriedades antioxidantes, estrogênicas, alelopáticas e inibidores enzimáticos. Usados como pigmentos, tanagem de couro e fermentação de chás. Na terapêutica tem atividade antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, reposição hormonal entre outras (SIMÕES et al., 2004).

Numa dieta alimentar normal, ingere-se aproximadamente de 20 mg a 1 g de flavonóides por dia (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996; DI CARLO et al., 1999), no entanto, são controversos os estudos de absorção dos flavonóides, alguns autores sugerem que a quercetina heterosídica tem melhor absorção que a aglicona (ROBARDS et al., 1999), enquanto outros pesquisadores dizem o oposto (MUROTA e TERAQ, 2003). Na espinheira-santa, a maior parte dos flavonóides é do tipo heterosídico. Segundo MUROTA e TERAQ (2003) a quercetina heterosídica é mal absorvida no intestino delgado, devido à porção açúcar que a torna mais hidrofílica. Após a ingestão, os heterosídeos são hidrolisados a agliconas no intestino delgado por enterobactérias. As agliconas pelo caráter mais lipofílico são melhores absorvidas no intestino grosso pelos fosfolipídeos de membrana. Em seguida, entram na circulação e no fígado sofrem O-metilação, glicuronidação ou sulfatação.



São excretados pela bile e retornam ao intestino, sendo reabsorvidas ou excretadas pelas fezes.

A determinação quantitativa dos flavonóides heterosídicos é difícil, devido à presença de diferentes açúcares ligados à molécula principal, além de possuírem açúcares ligados a outras moléculas de açúcares e em diferentes posições. (HERTOG, HOLLMAN e VENEMA, 1992). Os flavonóides heterosídicos têm a porção glicona normalmente ligadas à posição 3, no anel C (ROBARDS et al., 1999). Para o doseamento dos flavonóides utiliza-se a metodologia de espectrofotometria por UV e por CLAE, realizando uma hidrólise ácida do flavonóide para a retirada da parte glicona.

Os flavonóides do tipo flavonol apresentam duas bandas de absorção no UV, a Banda I (350-380 nm) devido ao anel B e a Banda II (250-270) representando o anel A (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970).

### 3.2.3 Atividade Biológica

A espinheira-santa apresenta diversos usos, são descritas ações anticonceptiva, abortiva, anti-séptica, digestiva, antiespasmódica, tratamento de feridas, de úlceras estomacais, diurética, laxativa, antiasmática, antitumoral, problemas hepáticos e disfunção erétil porém a principal indicação das folhas de espinheira-santa é o tratamento de gastrites, úlceras gástricas e duodenais (FERREIRA et al., 2004; HNATYSZYN et al., 2003; REIS e SILVA, 2004). SOUZA-FORMIGONI et al. (1991) confirmaram o efeito antiulcerogênico do extrato aquoso na administração oral e intraperitoneal em ratos, com aumento no volume e pH do suco gástrico. Esse efeito foi associado à presença de taninos hidrolisáveis (REIS e SILVA, 2004), porém FALEIROS et al.<sup>2</sup> citado por MAGALHÃES (2005) atribuíram o efeito às substâncias triterpênicas friedelina e friedelanol, enquanto que QUEIROGA et al. (2000) avaliando os efeitos desses triterpenos em modelo de úlcera induzida por indometacina em ratos, observaram que associados ou isolados foram inativos na redução das úlceras.

<sup>2</sup> FALEIROS, I.C.F. et al. Efeito antiulcerogênico de frações hexânicas das folhas de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa). **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Curitiba-Paraná. p.42, 1992.

OLIVEIRA et al.<sup>3</sup> citado por MAGALHÃES (2005), observaram que as catequinas 4'-O-metil-epigatocatequina e 4'-O-metil-*ent*-galocatequina reduziram a secreção gástrica de ácido.

O extrato aquoso seco obtido por "spray-dryer" das folhas não apresentou atividade antiulcerogênica significativa na administração oral em ratos machos Wistar, porém o extrato aquoso liofilizado reduziu em 77% a lesão em úlcera gástrica, utilizando a indometacina como ulcerogênica e cimetidina como antiulcerogênica. A menor atividade foi associada à diminuição de taninos (MARTINS, GUTERRES e ORTEGA, 2003). FERREIRA et al. (2004) demonstraram que o extrato aquoso liofilizado pode possuir um mecanismo de ação semelhante à cimetidina, um antagonista de receptores H<sub>2</sub> com ação na superfície serosa da mucosa gástrica e diminuição da secreção ácida.

LANÇAS et al. (1997) relataram os triterpenos e os polifenóis relacionados com a ação terapêutica da planta e VARGAS et al.<sup>4</sup> citado por RADOMSKI (1998) observaram que os flavonóides apresentam atividade antimutagênica e os taninos atividades antioxidativas, com ação antimutagênica e anticarcinogênica. JORGE et al. (2004), avaliaram a eficácia dos extratos hexânico (triterpenos) e acetato de etila (polifenóis - taninos condensados e flavonóides) como antiinflamatório, antinociceptivo e em lesões gástricas, como protetor e cicatrizante. O extrato hexânico apresentou melhor atividade que o acetato de etila, ambos mostraram ser ativos na dose de 320 mg/kg em ratos e houve aumento de volume gástrico e pH. As substâncias flavônicas apresentam atividade antiinflamatória pela diminuição na formação de mediadores proinflamatórios como as prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Os triterpenos são antiulcerogênicos pelo estímulo da síntese de muco ou pela manutenção do conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica em níveis elevados.

<sup>3</sup> OLIVEIRA, A.B. et al. Efeito de substâncias isoladas do extrato aquoso das folhas de *Maytenus ilicifolia* M. (Espinheira Santa) sobre a secreção gástrica de ácido. **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Curitiba-Paraná. p.055, 1992.

<sup>4</sup> VARGAS, V.M.F., et al. Estudo da atividade mutagênica de extratos vegetais com uso em medicina popular. **Rev. Bras. Farm.**, v.70, n. 3, p. 65-67, 1989.

Na parte apical das raízes encontram-se maitenina e pristimerina com atividade antimicrobiana, sendo que a maitenina apresenta discreta atividade em pacientes portadores de câncer de pele. As folhas mostraram atividade hepatoprotetora em ratos (REIS e SILVA, 2004).

As folhas de *M. ilicifolia* mostraram atividade em vasorrelaxamento possivelmente pelo envolvimento na produção de óxido nítrico, ativação da guanilato ciclase e abertura dos canais de potássio (RATTMANN et al., 2006).

REIS e SILVA (2004) relataram ausência de efeitos tóxicos em doses de até 400 vezes superiores às usadas na medicina popular, mas um efeito abortivo do extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de *M. ilicifolia* na dose de 1.000 mg/kg/dia com redução da taxa de implantação de embriões, enquanto que OLIVEIRA et al. (1991) não observaram efeito teratogênico significativo em ratos.

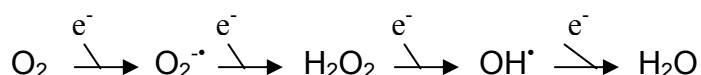
O extrato etanólico bruto das folhas de *Maytenus ilicifolia* atuou nos fungos fitopatógenos, inibindo o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* em 10% e estimulando o crescimento de *Colletotrichum acutatum* em 30% (CUNICO et al., 2002).

### 3.3 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Endogenamente, as mitocôndrias reduzem o  $O_2$  a ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), na sequência em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e água ( $H_2O$ ). Os intermediários são espécies reativas de oxigênio ou ERO. Além dessas substâncias, existem as ERN, que são espécies reativas de nitrogênio, como óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

As ERO e ERN são radicais livres com elétron desemparelhado no átomo de oxigênio ou nitrogênio, produzidos naturalmente ou em condições patológicas e estão associados às condições de vida aeróbica, sendo que a maioria dos radicais livres apresenta alta reatividade. Essas espécies em excesso podem agir nas células, oxidando e danificando proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Exogenamente, podem ser produzidas por fumaça de cigarro, poluentes atmosféricos, radiações ultravioleta, raio-X ou por alimentos (HIRATA, 2004; BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; SIRIWARDHANA et al., 2003).

FIGURA 5 - REAÇÕES ENDÓGENAS DE FORMAÇÃO DE EROS



As ERO e ERN são importantes em funções fisiológicas, porém em excesso, causam muitas doenças relacionadas à idade, como o envelhecimento precoce, processos inflamatórios ligados a prostaglandina, disfunção cerebral, câncer, doenças do coração, neurodegenerativas e digestivas entre outros danos (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999; LU e FOO, 2001; CHOI et al., 2002; SIRIWARDHANA et al., 2003; BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

### 3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os captadores do excesso de radicais livres no organismo, podem ter origem endógena (enzimática ou não-enzimática) e exógena. Os antioxidantes enzimáticos produzidos pelo organismo são as enzimas superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase. Os não-enzimáticos, GSH (Glutation), ácido diidrolipóico e alguns peptídeos. Exogenamente são obtidos de dieta alimentar, como vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -caroteno e substâncias fenólicas (HIRATA, 2004; BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

Atualmente existe um crescente interesse na capacidade antioxidante que alguns alimentos e produtos de origem vegetal apresentam. Isto, se deve ao fato de possuir a propriedade de impedir ou minimizar o estresse oxidativo que leva à inúmeras doenças. As plantas contêm substâncias captadoras de radicais livres, como os flavonóides, carotenóides e vitaminas. Estas moléculas antioxidantes agem no oxigênio singlete, nos produtos de decomposição de peróxido, como inibidores e sinergistas de enzimas e na quelação de metais (CHOI et al., 2002; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Alguns polifenóis têm a propriedade de inibir enzimas, como a ciclooxigenase, a lipoxigenase (CHEN et al., 1996) e a xantina oxidase, ou seqüestrar os radicais superóxidos.

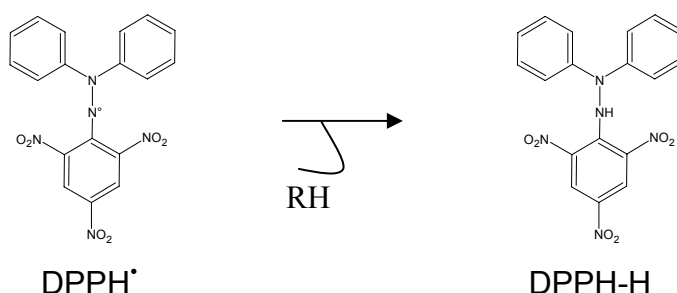
Os estudos da relação estrutura-atividade demonstraram que o número e a posição das hidroxilas, bem como as alquilações e as glicosilações interferem na atividade antioxidante dos flavonóides. A glicosilação e a metilação diminui a

atividade antioxidante dos flavonóides, enquanto que a o-hidroxilação do anel B, a carbonila na posição 4 e grupamento hidroxila na posição 3 e 5 aumenta a atividade (LU e FOO, 2001; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996; CHEN et al., 1996). De uma maneira geral, a atividade antioxidante diminui na seguinte ordem: flavanol> flavonol> chalcona> flavona> flavanona> isoflavona. Nos taninos, a atividade antioxidante melhora com o aumento dos grupamentos galoil, orto-hidroxilas e com aumento do peso molecular (YOKOZAWA et al., 1998; CAI et al., 2006).

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante, sendo baseado em dois princípios: reação de transferência de átomo hidrogênio (próton e elétron) e na transferência de elétron (HUANG, OU e PRIOR, 2005) podendo medir a capacidade antioxidante total, termo questionado por alguns pesquisadores (HUANG, OU e PRIOR, 2005) como o método da formação de um complexo fosfomolibdênio, ou a atividade antioxidante da planta ou substância em relação à redução de um radical, como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Nesse ensaio, o resultado pode ser expresso em IC<sub>50</sub>, que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical DPPH, sendo que quanto menor o IC<sub>50</sub>, maior a atividade antioxidante do material ou em poder antiradical, que é a relação inversa de IC<sub>50</sub> (1/ IC<sub>50</sub>).

O DPPH é um radical estável, que na presença de antioxidantes sofre redução, descolorindo-se e esta mudança é medida espectrometricamente a 517 nm (CONFORTI et al., 2002). Pode ser classificado de acordo com a cinética de reação entre antioxidante e o radical DPPH, em rápido (até cinco minutos), intermediário (cinco a trinta minutos) e lento (mais de trinta minutos) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995). Ele tem sido bastante utilizado nas análises de atividade antioxidante atuando no seqüestro de radicais livres. O radical pode aceitar um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável. O DPPH pode ser reduzido por glutathione, cisteína, ácido ascórbico, tocoferol, substâncias poliidroxiaromáticos e aminas aromáticas, porém não possui capacidade redox suficiente para ser reduzido pela glucose e substâncias aromáticas com apenas uma hidroxila. O ácido ascórbico reduz o DPPH na proporção molecular 2:1 (BLOIS, 1958).

FIGURA 6 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO DPPH\* PELO ANTIOXIDANTE



A atividade antioxidante do DPPH está relacionada com a presença de grupamentos hidroxilas dos flavonóides, sendo que os polifenólicos apresentam maior atividade que os monofenólicos, a posição do segundo e terceiro grupamento hidroxila também são importantes, quando em posição *orto* ou *para* o poder antioxidante é maior que em *meta* (BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER e BERSET, 1995). Os flavonóides glicosilados possuem uma capacidade seqüestrante de DPPH menor que os ácidos fenólicos, devido à presença de açúcares ligadas no anel A.

Em *M. ilicifolia* foi encontrado atividade antioxidante nas folhas e raízes (PESSUTO, 2006; VELLOSA et al., 2006).

### 3.5 SECAGEM

#### 3.5.1 Princípios de Secagem

A secagem requer um gradiente de pressão parcial de vapor de água entre o material e o ar de secagem. Segundo as propriedades higroscópicas, o fluxo de vapor da água ocorre da maior para a menor pressão parcial de vapor. Quando se aquece o ar de secagem há uma redução da umidade relativa e aumenta o potencial de retenção de água. Na secagem por convecção utilizando ar aquecido, ocorre uma transferência de calor do ar para o material e de massa (água) do material para o ar, onde a água contida no material é retirada mediante a transferência da água superficial para o ar e do movimento de água do interior para a superfície devido ao gradiente hídrico (MUJUMDAR, 1995; GARCIA et al., 2004).

A taxa de secagem relaciona o teor de água extraído com o decorrer do tempo e é representada pela curva de secagem (Fig. 7), que apresenta duas etapas distintas:

✓ (I) secagem a velocidade constante. Previamente, ocorre um equilíbrio de condições entre o ar quente e o sólido que começa a absorver calor sem a retirada da umidade. Na seqüência, durante a secagem à velocidade constante, a superfície do sólido encontra-se coberta com uma película de água que é transformada em vapor pelo calor latente de vaporização (energia necessária para romper as pontes de hidrogênio). A evaporação da água na superfície do sólido é substituída pela difusão interna numa taxa igual à evaporação e a temperatura mantém-se constante.

✓ (II) secagem a velocidade decrescente. O ponto final da velocidade constante é denominado umidade crítica, onde a velocidade começa a decrescer e pode ser dividido em duas etapas (nem todos os sólidos apresentam as duas etapas):

A) Zona de superfície de secagem não saturada. Tem início após a umidade crítica e a superfície do sólido apresenta áreas secas que se ampliam à proporção que a secagem prossegue. A água da superfície não é substituída a uma velocidade suficientemente rápida para manter o filme contínuo e a velocidade de secagem diminui. A evaporação continua a ocorrer na superfície do sólido e a resistência à difusão interna do líquido é pequena. O calor transmitido ao sólido que excede ao de vaporização da água é absorvido e eleva a temperatura porque recebe a mesma quantidade de calor do ar de secagem, porém a evaporação é menor.

B) Zona em que o fluxo interno da água controla o processo. A película de água na superfície é completamente evaporada e a velocidade de secagem é controlada pela difusão interna da água, que diminui à medida que a umidade no sólido decai. A evaporação nesta etapa geralmente ocorre no interior da estrutura do sólido, tendendo a concentrar cada vez mais para o interior. O ponto final desta etapa é denominado umidade de equilíbrio, quando a pressão de vapor no sólido é igual a pressão parcial de vapor do ar e o sólido está em equilíbrio com o ambiente (LIMA, 1971). A continuação da secagem constitui desperdício de energia e tempo.

### 3.5.2 Conteúdo de Água nas Plantas e Secagem de Plantas Medicinais

As plantas apresentam diferentes quantidades de água em diferentes órgãos: sementes e frutos de 5 a 10%, folhas 60 a 90%, raízes e rizomas 70 a 85% e as flores e frutos carnosos de 80 a 90% (BORSATO, 2003).

Algumas atividades metabólicas (processos enzimáticos, auto-oxidação, escurecimento não-enzimático), atividade bacteriana e fúngica não cessam quando são separadas partes da planta durante a colheita, sendo dependentes do conteúdo de água na planta. Por isso, é importante que a secagem se inicie o mais rápido possível após a colheita, prevenindo a deterioração do material coletado (HORNOK, 1992).

O conteúdo de água na planta pode ser classificado de acordo com o modo como a água se encontra ligada e sua retirada pela secagem (HORNOK, 1992):

- ✓ Água ligada quimicamente: possui uma alta energia de ligação com as macromoléculas (proteínas, carboidratos) formando a monocamada e mantendo a sua integridade estrutural. A remoção acontece somente com a destruição do material, portanto, não é removida pela secagem.

- ✓ Água ligada físico-quimicamente: pode estar ligada por adsorção e osmoticamente. A primeira possui energia de ligação mais alta e não pode ser retirada com a secagem. A água ligada osmoticamente apresenta propriedade similar a uma solução concentrada, ocupa poros e capilares, não interage diretamente com a superfície das macromoléculas e pode ser retirada parcialmente.

- ✓ Água ligada mecanicamente: a água apresenta propriedade similar à solução diluída e é considerada água livre. Encontra-se situada superficialmente e nos macrocapilares e é removida mais facilmente. A remoção acontece em diferença de concentração e de temperatura (a água migra de lugares de maior quantidade para os de menor quantidade de água e de lugares mais quentes para os mais frios, por movimento térmico das moléculas).

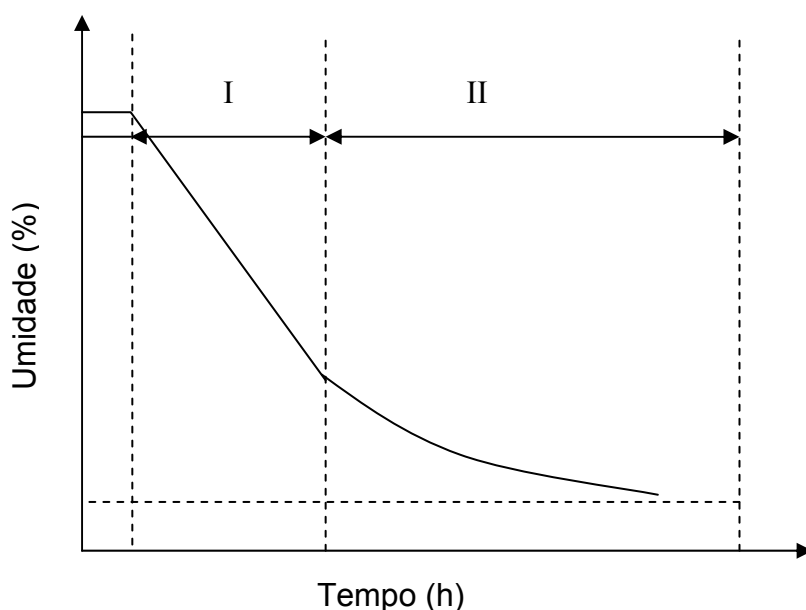
A taxa de secagem depende da temperatura e do fluxo de ar no secador, sendo que quanto maiores, mais rápida se processa a secagem. Se a temperatura e o fluxo de ar forem muito altos, a taxa de secagem supera a taxa de migração da água e os capilares são fechados, impedindo a saída de água da planta e só



acontecerá num aumento de temperatura, o que pode provocar degradação do material (HORNOK, 1992).

Quando ocorre a evaporação na superfície da planta, a umidade se desloca das camadas internas para a superfície por difusão. O movimento da umidade é causado pelo gradiente de concentração entre o interior e a superfície da planta (LIVI, 2004). No início da secagem o teor de umidade interna é elevado e o gradiente de concentração é alto, assim, a quantidade de líquido difundido para a superfície é igual ao evaporado, mantendo a velocidade constante. No decorrer da secagem, o gradiente de concentração vai diminuindo até que a velocidade de secagem torna-se controlada inteiramente pela difusão da água no interior da planta (LIMA, 1971).

FIGURA 7 - CURVA TEÓRICA DE SECAGEM DE PLANTAS MEDICINAIS



FONTE: HORNOK (1992).

NOTAS: I - Elimina água ligada mecanicamente e parte da água ligada osmoticamente

II - Elimina água ligada osmoticamente até equilíbrio com a umidade relativa do ar (ponto final de secagem).

O processamento pós-colheita é um dos pontos críticos no processo produtivo de plantas medicinais e aromáticas. As plantas medicinais são sensíveis ao processo de secagem e as temperaturas a que são submetidas podem causar

alterações na quantidade e qualidade dos princípios ativos, principalmente nos teores de óleo essencial, porém no geral, temperaturas entre 40 °C e 60 °C foram as sugeridas para a secagem (MELO, RADÜNZ e MELO, 2004; NEGRI et al., 2006).

A secagem é mais eficiente em maior temperatura, maior velocidade do ar e menor umidade relativa (BORSATO, 2003), porém altas temperaturas promovem o rompimento das estruturas celulares, levando à morte ou desencadeamento de reações enzimáticas e não enzimáticas alterando a cor, o sabor e o odor da planta. O efeito térmico pode hidrolisar e degradar carboidratos causando escurecimento. As espécies medicinais ou aromáticas, onde as substâncias ativas estão concentradas nas folhas devem ser secas imediatamente após coleta a fim de manter suas propriedades medicinais e de estabilidade. O material deve ser distribuído em camadas finas, sem compactação permitindo boa circulação do ar. Recomenda-se que a secagem seja rápida, com calor moderado, circulação de ar e ausência de luz solar. Nas secagens empregando temperaturas abaixo de 80° C não ocorre degradação de enzimas, mas inibição, podendo ser reativadas (BORSATO, 2003). A secagem de plantas causa uma desidratação reduzindo a ação das enzimas e contaminação microbiana, conservando a planta por tempo superior. A desidratação aumenta o teor de princípios ativos em relação ao peso da droga vegetal. As plantas medicinais devem ter o conteúdo de umidade mais baixo possível evitando mofo e contaminação microbiana.

Os métodos de secagem são variados: ar aberto; em camadas finas em bandejas de secagem; salas ou construções com telas de arame; pela luz direta do sol, se conveniente; em secadores solares; por fogo indireto; estufa; liofilização; microondas ou infravermelho. É conveniente controlar a temperatura e a umidade. A secagem à sombra é melhor que em luz direta do sol por preservar a cor de folhas e flores; para substâncias voláteis, usar baixas temperaturas e as condições de secagem deve ser registrado. Para secagem em ambiente aberto, espalhar o material em camadas finas e revolver com frequência. Não dispor o material diretamente no chão ou piso, mas em estrados ou estrutura protetora. O local de secagem deve ser ventilado, protegido de poeira, da entrada de animais, de insetos e de roedores. Quando a secagem ocorrer em ambientes fechados, a duração, a temperatura e a umidade devem ser consideradas para a parte da planta que se pretende utilizar (folha, flor, raiz ou caule). Recomenda-se usar temperatura de 20 a

40 °C para as folhas; evitar o aquecimento direto, preferentemente usar gás butano, propano ou natural e evitar o contato de fumaça com o material a secar. O material deve ser disposto em camadas finas de 3 cm para as folhas, permitindo circulação do ar entre as partes vegetais (WHO, 2003; CORREA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994).

O sistema de controle automático da temperatura do ar de secagem evita as diferenças de temperatura noturnas e diurnas mantendo a variação em valores desejáveis a um processo de secagem sem a presença de operadores (JESUZ et al., 2001), porém os secadores normalmente são constituídos de uma fornalha externa com tubulação levando o ar aquecido até o interior da sala de secagem. (CORREA JUNIOR, MING e SCHEFFER, 1994).

Durante a secagem da camomila temperaturas de 80 e 95 °C proporcionaram maior taxa de secagem, porém a última conferiu cor caramelo (indesejável), sendo mais atenuada sob 80 °C (BORSATO, 2003).

Para a secagem de alecrim-pimenta, *Lippia sidoides* Cham., temperaturas de até 70 °C não ocasionaram perda considerável no teor de óleo essencial, com a vantagem de redução do tempo, custos e melhor utilização do secador para o produtor (RADÜNZ et al., 2002a).

COSTA, CASALI e MACEDO (1999) avaliaram a secagem das folhas de guaco em dois tipos de secadores: estufa e câmara com desumidificador. A primeira apresentou melhor qualidade quanto às características organolépticas, onde conservou a coloração esverdeada; enquanto que na segunda, as folhas apresentaram manchas escuras devido aos taninos que por oxidação pela enzima polifenol oxidase (PPO) e por polimerização originam melaninas. Geralmente, não se recomenda a lavagem prévia das plantas medicinais antes da secagem, porém em estudo com as folhas de guaco, a lavagem prévia com água e solução de propolína a 1% melhorou a qualidade microbiológica. RADÜNZ et al. (2002b), secando folhas de guaco à temperatura ambiente e em temperaturas de 40 a 85 °C observou que as folhas secas à temperatura ambiente apresentaram coloração escura indicando deterioração enquanto que nas temperaturas mais elevadas houve preservação da coloração.

A secagem do capim-limão, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, em temperaturas de 40, 50 e 60 °C combinada com velocidade do ar de 0,5 e 1,0 m.s<sup>-1</sup>

apresentou uma redução no tempo de secagem, de 305 para 105 min a  $0,5 \text{ m.s}^{-1}$  e 230 para 77 min a  $1,0 \text{ m.s}^{-1}$  quando se aumentou a temperatura de 40 para 60 °C (MARTINS et al., 2000).

JULKUNEN-TIITO e SORSA (2001) estudando o efeito dos métodos de secagem em flavonóides, taninos e salicilatos do salgueiro, observaram que o calor empregado nas secagens (60 e 90 °C) pode determinar mudanças na composição dos fenólicos, com exceção da apigenina-7-glucosídeo. As folhas tornaram-se marrons indicando a decomposição dos fenólicos em quinonas e as concentrações de flavanonas naringenina-7-glucosídeo e eriodictiolglicosídeo reduziram em 50 e 60% respectivamente em relação às folhas frescas. As flavanonas e as flavonas glucosídicas apresentaram-se mais sensíveis que os flavonóis glucosídeos e para os flavan-3-óis, catequinas e taninos condensados, o calor causou forte decomposição (a 60 °C, diminuição de 40% e a 90 °C, 79%).

Avaliando a capacidade antioxidante pelo método do DPPH\* do tomate seco em estufa a 40 °C e liofilizado, o segundo apresentou valor 30% superior ao primeiro (VEDANA et al., 2006). BASTOS et al. (2006) demonstraram que na secagem de folhas de *Inga edulis* Mart., a melhor temperatura de secagem sem diminuição da atividade antioxidante foi de 54 °C.

Segundo BRITO et al. (1999), devem ser tomados alguns cuidados prévios à secagem, como: evitar a lavagem das folhas e talos. Se necessário, lavar rapidamente com água limpa e agitar levemente. Separar as espécies diferentes, impedir a incidência de raios solares diretamente sobre as plantas, eliminar as impurezas como terra, pedras, outras plantas e partes da planta em condições indesejáveis, sujas, descoradas, manchadas e danificadas, separar as partes das plantas para a secagem: folhas, flores, sementes, frutos e raízes.

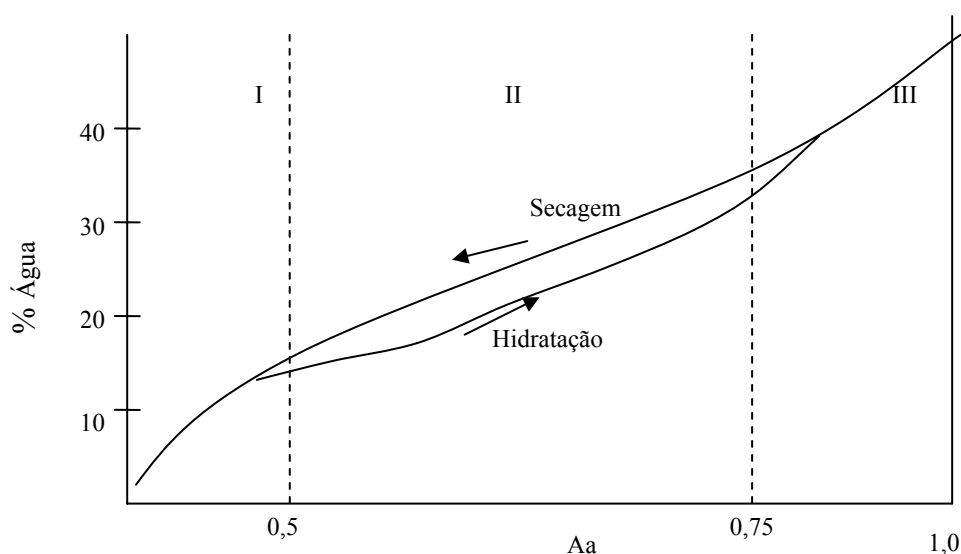
### 3.5.3 Atividade de Água

A atividade de água é um teste realizado principalmente em alimentos como um parâmetro da qualidade e serve para indicar a quantidade de água livre na amostra. A água nos alimentos ou em plantas pode estar livre ou combinada. A água livre são moléculas de água que não estão ligadas química ou fisicamente ao substrato, funciona como solvente e é eliminada com relativa facilidade, permitindo o

crescimento de microorganismos e a ocorrência de reações químicas. A água combinada encontra-se fortemente ligada ao substrato, sendo mais difícil de ser retirada, e não é utilizada como solvente, não permitindo o desenvolvimento de microorganismos e retardando as reações químicas (BOBBIO e BOBBIO, 2001; DECAGON, 2001).

A atividade de água (Aa) é definida como o grau de disponibilidade da água no vegetal, representando a relação entre a pressão de vapor da água no material (Pv) e a pressão de vapor da água pura (Pvo) a uma mesma temperatura, sendo que em ambiente fechado e em equilíbrio pode ser medida como umidade relativa de equilíbrio (URE), onde este é 100 vezes o valor de Aa (DITCHFIELD, 2000; SANTOS, 2004).  $Aa = \% \text{ URE} / 100 = P_v / P_{v_0}$ . A figura 8 mostra as curvas de secagem e hidratação em equilíbrio de um alimento em função da atividade de água.

FIGURA 8 - CURVAS DE EQUILÍBRIO NA SECAGEM E HIDRATAÇÃO EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA



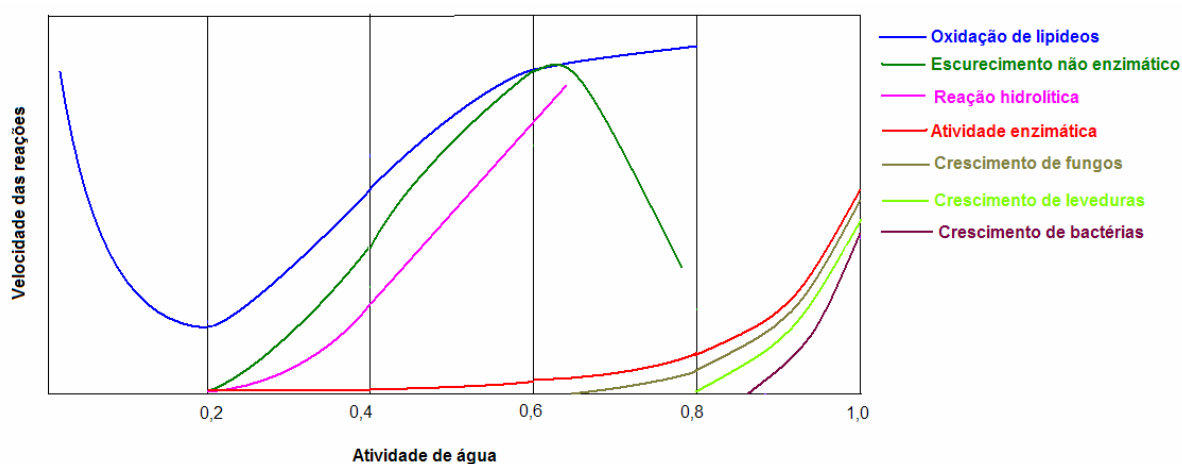
FONTE: BOBBIO e BOBBIO (2001)

NOTA: I - Água da camada primária unida a grupos ionizáveis ou fortemente polares  
 II - Água pode atuar como solvente  
 III - Água livre, retida mecanicamente nos capilares, pode formar soluções.

O valor máximo de Aa é igual a 1 na água pura. Quando  $Aa > 0,9$  podem ocorrer crescimento de microorganismo, porém as reações químicas e enzimáticas podem ter sua velocidade diminuída pela baixa concentração de reagentes. Para Aa

de 0,4 a 0,8 podem ocorrer reações químicas e enzimáticas, enquanto que  $Aa \approx 0,6$  pouco ou nenhum crescimento microbiano ocorre, sendo que os fungos são os microorganismos mais resistentes a diminuição da atividade de água, agindo na faixa de 0,6 a 0,7 possivelmente devido ao fato de que nessa faixa não ocorre competição com bactérias (DITCHFIELD, 2000).  $Aa < 0,3$  entram na zona de absorção primária, onde as moléculas de água poderão estar ligadas a pontos de absorção primária (ex: grupos COOH) e por pontes de hidrogênio. Em alimentos, a água nesta região está fortemente ligada formando a monocamada (pode ser mais de uma camada), que são finas camadas de água recobrendo macromoléculas e não participam de reações ou desenvolvimento microbiano (BOBBIO e BOBBIO, 2001). Em  $Aa \leq 0,2$  as reações são inibidas, com exceção da oxidação de lipídios.

FIGURA 9 - DIAGRAMA DE ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA



FONTE: DECAGON, 2006

### 3.5.4 Aspectos Microbiológicos

A secagem é um método antigo de preservação de alimentos contra danos microbiológicos, porém o processo pode não ser letal a todos os microorganismos e muitas espécies podem sobreviver. Os mais resistentes são as bactérias formadoras de esporos, os bolores, as leveduras e as bactérias termo-resistentes. A sobrevivência de microorganismos durante e após a secagem dependerá das condições físico-químicas, como atividade de água, temperatura, pH, uso de conservantes e presença de oxigênio. Os fatores que influenciam a contaminação são: a qualidade da planta fresca, o tempo entre a coleta e o início da secagem, o

tempo e a temperatura de secagem, o teor de umidade final e os cuidados de higiene durante e após a secagem. A remoção da água pela secagem aumenta a concentração de solutos e reduz a disponibilidade da água para crescimento de microorganismos, mas para uma completa estabilidade, recomenda-se uma atividade de água abaixo de 0,6 (MUJUMDAR, 1995; WHO, 1998).

As matérias vegetais tendem a apresentar carga microbiana mais elevada que materiais sintéticos; a explicação é a origem desses materiais pois a maioria dos microorganismos encontrados em plantas é comum em solo e água, como *Bacillus* sp, coliformes e *Pseudomonas* sp, tornando freqüente a contaminação de plantas medicinais. A presença de coliformes e enterococos indicam condições precárias de higiene na manipulação (MUJUMDAR, 1995; SMET, 1999).

Noventa e uma amostras de plantas medicinais, entre elas a espinheira-santa, foram recolhidas na cidade de São Paulo e analisadas. Desse total, 93,2% estavam em desacordo com as especificações para a pesquisa de microorganismos, porém não foram encontrados *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus*, enquanto que uma amostra apresentou *Pseudomonas aeruginosa* (BUGNO et al., 2005).

Os fungos podem contaminar as plantas pelo ar, antes e após a colheita ou nos processamentos pós-colheita. Os principais gêneros encontrados no Brasil são *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Foram encontradas 92,5% das amostras contaminadas por fungos em sene e boldo-do-Chile adquirido de farmácias de manipulação e mercados na cidade de Campinas, desses, 45% com níveis acima do estabelecido pela OMS, com destaque para os fungos produtores de micotoxinas, *Aspergillus* e *Penicillium*, com 10% e 7,5% de amostras contaminadas respectivamente (ROCHA, SOARES e CORRÊA, 2004).

ZARONI et al. (2004), analisaram setenta e duas amostras recolhidas de diversas localidades no Estado do Paraná, onde a maioria delas (79%) apresentou contaminações acima dos níveis permitidos pela OMS tanto para uso na forma de chá, infusão e tópico quanto para uso interno.

CRUZ, CENCI e MAIA (2006) acompanharam a produção de hortaliças numa localidade do Estado de São Paulo com objetivo de implantar boas práticas de produção agrícola, observaram a baixa qualidade quanto a hábitos sanitários, estrutura deficiente de banheiros, falta de procedimentos escritos e definidos, de

treinamentos em higiene ou microbiológico, onde até mesmo o supervisor não havia recebido qualquer treinamento em processamento de produtos alimentícios.

Esse panorama de baixa qualidade de plantas medicinais devido à alta contaminação microbiana também ocorre em outros países. Na Inglaterra, Áustria e Espanha a contagem de bactérias acima de  $2.10^3$  UFC/g (especificação da Farmacopéia Americana para produtos de uso oral) foi de 52,7%, 94,5% e 26,3% respectivamente. Para contaminação fúngica em plantas medicinais acima de  $10^2$  UFC/g; na Espanha, Portugal, Egito, Croácia e Polônia os valores foram de 87,5%, 93,5%, 100%, 90,3% e 90%, respectivamente (MARTINS et al., 2001; BUGNO et al., 2005).

#### 3.5.5 Secagem de Espinheira-santa

Quando cultivado a pleno sol as folhas apresentam-se coriáceas, com baixa umidade, em torno de 50%. Após a colheita recomenda-se secar as folhas aderidas aos galhos, pois a retirada é difícil (MAGALHÃES, 1997). A secagem se inicia a partir do corte dos ramos, onde as plantas entram num processo de perda de água para o ambiente. A secagem da planta quando feita em secadores, as temperaturas variam de 30 °C a 60 °C e os tempos de 2 a 25 horas. Tanto a temperatura quanto o tempo elevado pode prejudicar a qualidade do produto (REIS e SILVA, 2004). O ponto final de secagem é determinado pelo produtor quando as folhas ficam “crocantes”, quebrando facilmente ao serem dobradas. A umidade nesse ponto é aproximadamente 5%, mas absorve umidade se deixada exposta ao ambiente pela higroscopicidade, podendo chegar de 8 a 12%.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Ramos e folhas de *Maytenus ilicifolia*, cultivados ao pleno sol, foram coletados no município de Araucária - PR, nos meses de janeiro a março de 2006. As amostras foram transportadas até o município de Campo Largo - PR para a secagem em secador. Foram utilizadas as temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80° C e conforme a rotina de secagem de um beneficiador de plantas medicinais. Um exemplar da exsicata encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob o n.º 53031.

### 4.2 EQUIPAMENTOS

#### 4.2.1 Balança Infravermelho Marca Top Ray BEL engineering – Infrared Moisture Balance

A radiação infravermelha tem como princípio de aquecimento a transformação de energia eletromagnética em energia cinética, liberando energia térmica (BORGES et al., 2005). A determinação da umidade é semelhante ao desenvolvido em estufa e uma balança de precisão, onde o princípio é a diferença de peso na amostra: (amostra+umidade) - (amostra seca). Utiliza como fonte de aquecimento uma lâmpada de halogênio (400 W) e a sensibilidade da balança é de 0,001 g (LABORCHEMIKER). O equipamento possui dois modos de operação: programado (estipula-se o tempo de secagem e a temperatura) e automático (determina-se a taxa de variação mínima para a umidade por unidade de tempo e a temperatura). O ponto final é avisado por meio de sinal sonoro.

#### 4.2.2 Espectrofotômetro UV-Visible Shimadzu 1601

As análises constantes na tabela 1 foram realizadas em espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda 400 a 800 nm (região visível).

TABELA 1 - ANÁLISE EM ESPECTROFOTÔMETRO E COMPRIMENTO DE ONDA CORRESPONDENTE

ANÁLISE	COMPRIMENTO ONDA (nm)
Antioxidante - Fosfomolibdênio	695
Antioxidante - DPPH	517
Flavonóides	425
Polifenóis Totais e Taninos - REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA (1981).	720
Taninos Totais e Frações (FB IV, 2003)	750

#### 4.2.3 Detector de atividade de água

Utilizado o aparelho Aqualab Modelo CX-2 que mede a atividade de água pela técnica do ponto de orvalho. O aparelho é constituído por uma câmara contendo um espelho de aço que é aquecido e resfriado constantemente. Dessa forma o orvalho é formado e evaporado. Uma ventoinha de ar contribui para o equilíbrio dentro da câmara. Conforme ocorre a formação do orvalho e evaporação, o equipamento faz a leitura da temperatura e o cálculo da atividade de água em período determinado de tempo. Quando a diferença da atividade de água entre duas medidas for menor que 0,001 o instrumento dispõe a leitura no visor e aciona um sinal de ponto final de análise. Não é necessário calibrar o equipamento, porém testam-se a linearidade com solução salina padrão e água destilada. Para a água destilada a atividade deve ser de  $1,000 \pm 0,003$ . Caso o valor seja superior ou inferior ao especificado deve-se limpar o espelho e repetir a medida (DECAGON, 2001).

#### 4.2.4 Estufa

As análises de umidade foram realizadas em estufa marca FANEN e controlada a temperatura entre 100 e 105 °C por termômetro.

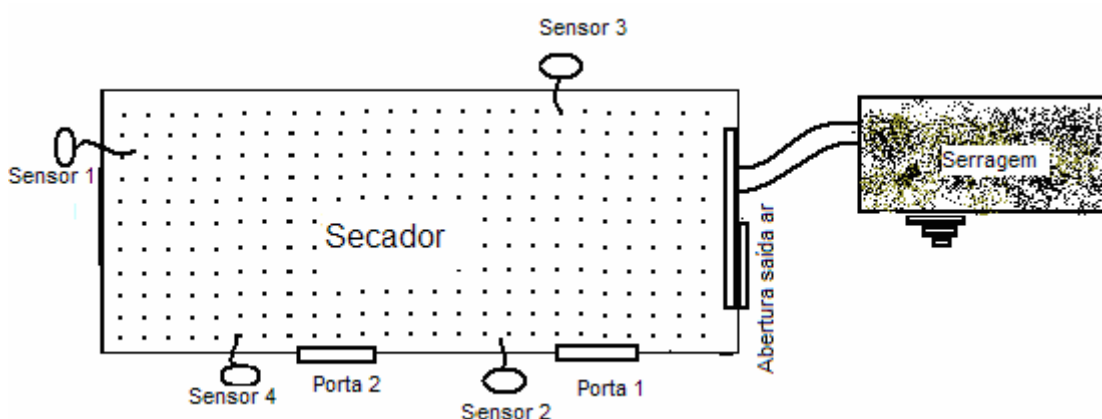
#### 4.2.5 Sensores de Temperatura

Foram instalados 4 sensores de termometria marca PROW Modelo CT-300R.

### 4.3 PROCESSO DE SECAGEM

A secagem foi realizada em secador de plantas, que consiste de uma construção de alvenaria onde a base é constituída de placas metálicas perfuradas para a entrada do ar aquecido. O aquecimento do ar é por meio de uma fornalha alimentada com serragem de madeira. A secagem foi monitorada através de sensores instalados em diferentes pontos do secador. As leituras das temperaturas foram realizadas imediatamente antes da coleta de material para análise de umidade.

FIGURA 10 - MODELO DO SECADOR UTILIZADO NA SECAGEM DA ESPINHEIRA-SANTA



### 4.4 AMOSTRAGEM

Foram coletadas amostras com intervalos regulares de 1 hora, sendo a primeira coleta na hora 0 antes do início da secagem. As amostras foram fragmentadas em moinho de facas e passadas em tamis de 2,8 mm de abertura para uniformização, segundo a especificação da FB IV (2000) (máximo 3 mm). As análises foram em triplicata pelo método gravimétrico e por analisador de umidade por infravermelho. O ponto final da secagem foi em teor de umidade igual ou inferior a 6% (FB IV, 2003; BORGES et al., 2005).

#### 4.5 MEDIDAS DE TEMPERATURAS DE SECAGEM

As temperaturas de secagem foram determinadas por sensores de temperaturas de bulbo seco instalados em quatro pontos do secador. Foram utilizadas as temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80° C e conforme a rotina de secagem de um beneficiador de plantas medicinais (temperatura máxima de 90°C).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE NA PLANTA

A Farmacopéia Brasileira (1988) apresenta três metodologias para determinação de água em drogas vegetais: gravimétrico (perda por dessecação), azeotrópico (destilação de tolueno) e volumétrico (Karl Fisher). O método gravimétrico não se aplica quando a droga contém substâncias voláteis e os dois seguintes requerem equipamentos especiais e técnicas complexas.

O método de secagem por radiação infravermelha acoplada a balança, chamado analisador de umidade está sendo bastante utilizado na determinação de umidade de alimentos e medicamentos nos processos produtivos industriais por ser rápido e de leitura direta no visor do aparelho (BORGES et al., 2005).

Os ensaios foram realizados em triplicata nas duas metodologias.

##### 4.6.1 Perda por Dessecação (FB IV, 2000)

O princípio é a transferência de calor por convecção, onde a energia térmica fornece calor para a liberação das moléculas de água do produto, onde além da água ocorre quantificação de substâncias voláteis. O método é oficial, porém o tempo de análise é longo, dificultando a realização em rotina de trabalho. Na perda por dessecação, a amostra deve ser seca em estufa a 100-105 °C até que duas pesagens consecutivas não sejam maiores que 5 mg (WHO, 1998). O material deve ser preparado por corte, granulação ou moagem até o tamanho menor que 3 mm e evitar o uso de triturador de alta velocidade.

#### 4.6.2 Analisador de Umidade – Balança por Infravermelho (BORGES et al., 2005)

O método é rápido e já foi validado, possibilitando uma alternativa viável ao produtor no processamento pós-colheita de plantas medicinais.

A amostra foi triturada em moinho de facas e homogeneizada a 2,8 mm em tamis ABNT nº 7. Acondicionado 4 g em prato metalizado de 10 cm diâmetro, de forma a preencher todo o fundo do recipiente. Foi utilizado o modo automático segundo especificação do fabricante (LABORCHEMIKER) com as seguintes condições de análise: temperatura de análise = 90 °C, término de análise = variação menor que 0,1% (4 mg) em 90 segundos, intervalo entre análise de no mínimo 2 minutos.

#### 4.7 ATIVIDADE DE ÁGUA

A amostra foi triturada em moinho de facas e homogeneizada a 2,8 mm em tamis ABNT nº 7. A análise foi realizada conforme especificação do fabricante, em triplicata (DECAGON DEVICES INC., 2001).

#### 4.8 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE POLIFENÓIS

##### 4.8.1 Polifenóis Totais e Taninos (REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA, 1981).

O método fundamenta-se na medida da cor azul formada na redução do reagente fosfotúngstico-fosfomolibdico (reagente de Folin-Denis) em presença de álcali (carbonato de sódio). A reação quantifica polifenóis pela presença de hidroxilas fenólicas. Para o doseamento de taninos realiza-se a precipitação ou adsorção desses com pó-de-pele cromada.

As análises foram realizadas em triplicata.

- Extração de polifenóis totais (RADOMSKI, 1998): Pesado 0,25 g de folhas trituradas de espinheira-santa, transferido para balão de refluxo de 500 mL com 250 mL de água destilada. Aquecido em banho-maria, sob refluxo, por 30 minutos. Resfriado e completado o volume com água destilada para 250 mL. Filtrado através

de papel de filtro, desprezando os primeiros 50 mL de filtrado. O filtrado constituiu a solução-mãe (SM).

- Polifenóis totais: a 1 mL da SM foi acrescentado 1 mL de reativo de Folin-Denis e 10 mL de carbonato de sódio a 20%. Medido a absorvância em 720 nm, 20 minutos após a adição do último reagente. Como branco utilizado a água. Polifenóis Totais: A

- Polifenóis não tanantes: a 5 mL da SM acrescentado 50 mg de pó-de-pele cromada. Agitado por 60 minutos em agitador magnético e filtrado através de papel de filtro. Tomado 1 mL do filtrado para a reação de Folin-Denis. Polifenóis não tanantes: B

Taninos: Absorvância (A - B).

- Substância referência: pirogalol (Merck) nas concentrações a 0, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL em água. Pela equação da reta foram calculadas as concentrações de pirogalol nas amostras. Resultado em mg% de pirogalol.

#### 4.8.2 Taninos Totais, Fração Não-tanante e Fração Tanante (FB IV, 2003)

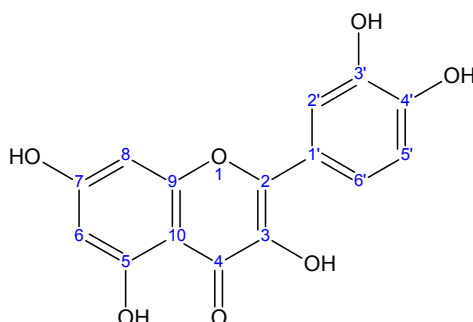
Esta metodologia foi efetuada segundo monografia de *Maytenus ilicifolia* constante na Farmacopéia Brasileira IV (2003). O método baseia-se na redução do reativo de Folin-Denis, sendo o diferencial do método anterior, o tempo reduzido de análise (de 20 para 2 minutos), o comprimento de onda de 750 nm e o uso da caseína para a retirada da fração tanante da amostra. O resultado é dado em % (p/p). As análises foram efetuadas em quintuplicata.

#### 4.8.3 Flavonóides

A metodologia de doseamento de flavonóides foi realizada segundo a monografia de barbatimão constante na Farmacopéia Brasileira IV (2002). A substância referência utilizada é a quercetina, porém o seu doseamento não está descrito, dessa maneira, adicionalmente foi elaborado a curva analítica de quercetina com sete concentrações diferentes para os cálculos. O resultado é dado em percentagem (p/p) de quercetina. As análises foram em triplicata. O método é um dos procedimentos analíticos mais usados para o doseamento de flavonóides

(PETRY, ORTEGA e SILVA, 2001) e está baseado na formação de um complexo estável entre o íon metálico alumínio e o grupamento quelatogênico dos flavonóides trazendo mudança no espectro de absorção ultravioleta (JURD e GEISSMAN, 1956). O complexo formado causa um efeito batocrômico na banda I de aproximadamente 45 nm (aumento do comprimento de onda), indicando um flavonol 5-hidroxi-3-O-substituído (SANNOMIYA et al., 1998) possibilitando a quantificação dos flavonóides e eliminando a interferência de outros fenólicos. A leitura é realizada em 425 nm após trinta minutos da adição de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) e solução metanólica de ácido acético. O  $\text{AlCl}_3$  pode se complexar entre as hidroxilas 3' e 4' e a carbonila 4 com as hidroxilas da posição 3 e 5 (Fig. 11).

FIGURA 11 - ESTRUTURA DE FLAVONÓIDES E HIDROXILAS QUE REAGEM COM  $\text{AlCl}_3$



#### 4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

- Preparo da amostra: folhas trituradas e tamisadas a 2,8 mm foram levadas à extração com etanol p.a. (concentração de 20 g% p/v) e macerado por 24 horas em BM a 60 °C. Filtrado em papel de filtro e o resíduo foi levado à nova extração hidroalcoólica (etanol 70%) e na seqüência com água. Os filtrados foram reunidos e levados à secura em BM a 60 °C. O material sólido seco constituiu o extrato seco.

##### 4.9.1 Método fosfomolibdênio (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999)

O método é baseado na redução de Mo (VI) a Mo (V) e na formação de um complexo verde fosfato/Mo (V) em pH ácido.

A amostra foi preparada a 200 µg/mL do extrato seco em água. A uma fração de 0,3 mL foi acrescentado 3 mL do reativo fosfomolibdico (molibdato de

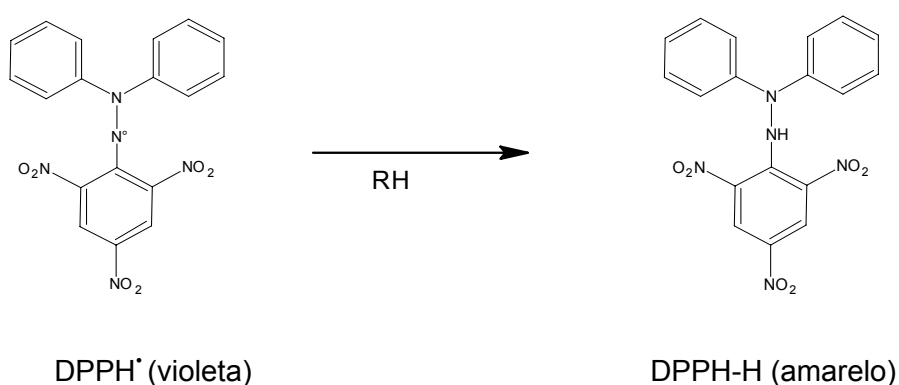
amônio 4 mM, fosfato sódico monobásico 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). O branco era constituído de 0,3 mL água e 3 mL do reativo. Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Resfriado e realizado a leitura em espectrofotômetro UV a 695 nm, zerando o aparelho com água. As substâncias referências foram ácido ascórbico (AA) e rutina a 200 µg/mL. Para o cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como sendo 100% de atividade antioxidante.

% Ativ. Antioxidante =  $\frac{\text{Absorvância da amostra} - \text{absorvância do branco}}{\text{Absorvância AA} - \text{absorvância branco}} \times 100$

#### 4.9.2 Método DPPH• (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila)

O método é baseado na metodologia de BLOIS (1958) modificado por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995) e utiliza o radical estável DPPH• que sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela proporcional à concentração da substância redutora da amostra (Fig. 12).

FIGURA 12 - MUDANÇA DE COLORAÇÃO NA REAÇÃO DE DPPH• COM ANTIOXIDANTE



Inicialmente foi determinada a cinética de reação, a fim de verificar o tempo necessário que o extrato de espinheira-santa leva para reduzir o DPPH.



- Cinética de reação: o extrato seco (amostra seca a 80 °C) foi dissolvido em etanol p.a. a 50 µg/mL. A uma fração de 3 mL da amostra foi adicionado 0,1 mL de DPPH a 1 mM. O aparelho foi zerado com etanol. A amostra foi homogeneizada rapidamente e a leitura efetuada em espectrofotômetro UV em 517 nm a cada 5 minutos até estabilização do resultado.

#### 4.9.2.1 Determinação do IC<sub>50</sub>

IC<sub>50</sub> da amostra: soluções etanólicas do extrato seco nas concentrações de 0,625 a 10 µg/mL. A uma fração de 3 mL foi acrescentado 0,1 mL de DPPH a 1 mM. Como controle positivo foi utilizado 3 mL de etanol e 0,1 mL de DPPH. Após 30 minutos, efetuado a leitura em espectrofotômetro UV a 517 nm. Zerado o aparelho com etanol. Como branco, utilizado a própria amostra.

- IC<sub>50</sub> das substâncias referências: Ácido ascórbico (AA) (Merck): utilizado concentrações de 0,078 a 5 µg/mL em etanol. Rutina (Merck): as concentrações foram de 0,625 a 10 µg/mL em etanol.

#### 4.9.2.2 Poder antiradical

O poder antiradical é a relação inversa de IC<sub>50</sub> (1/IC<sub>50</sub>), também é uma medida utilizada para a comparação de resultados e expressa mais claramente os valores obtidos. Dessa maneira, quanto maior o poder antiradical maior a atividade antioxidante da amostra em relação ao radical DPPH.

### 4.10 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As análises foram realizadas pela metodologia preconizada pela OMS nos “ensaios microbiológicos em plantas medicinais”, realizando a contagem para enterobactérias, *E.coli*, bactérias aeróbicas e bolores e leveduras e pesquisa para *Salmonella* sp, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (WHO, 1998).

#### 4.10.1 Pré-tratamento da amostra

Amostra 1: 10 g da planta triturada e tamisada a 2,8 mm suspenso em 90 mL de caldo lactose.

Amostra 2: 10 g da planta triturada e tamisada a 2,8 mm suspenso em 90 mL de caldo AP tamponado.

Homogeneizado as amostras um minuto a 200 rpm em aparelho Stomacher 400 circulator Seward.

#### 4.10.2 Contagem de microorganismos

##### 4.10.2.1 Bactérias aeróbicas

Amostra 1 nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  g/mL em placa ACS a 35 °C por 48 horas.

##### 4.10.2.2 Enterobactérias

Amostra 1 em caldo lauril triptose nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  g/mL a 35 °C por 48 horas.

Placas de EMB a 35 °C por 24 horas.

Confirmação: Meio IAL a 35 °C por 24 horas.

##### 4.10.2.3 *Escherichia coli*

Amostra 1 em caldo lauril triptose nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  g/mL a 35 °C por 48 horas.

Repicado em caldo EC a 44,5 °C por 24 horas e caldo bile a 35 °C por 48 horas

Do caldo EC para placas de EMB a 35 °C por 24 horas.

Confirmação: Meio IAL a 35 °C por 24 horas.

Meio IMViC a 35 °C por 4 dias.

Contagem de *E.coli* em tubos (+)

#### 4.10.2.4 Bolores e leveduras

Amostra 1 nas concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  g/mL em placa ágar Sabouraud a 25 °C por 5 dias.

#### 4.10.3 Pesquisa de microorganismos

##### 4.10.3.1 Enterobactérias

Amostra 1 diluída 1:10 em caldo lauril triptose a 35 °C por 24 horas.

Placa EMB, Teague a 35 °C por 24 horas.

Meio IAL a 35 °C por 24 horas.

##### 4.10.3.2 *Salmonella* sp

Amostra 1 a 42 °C por 24 horas e inocular:

a) - caldo Kauffmann, Selenito e Rappaport na proporção 1:10 a 35 °C por 24 horas.

- placas Teague e SS a 35 °C por 24 horas.

- meio IAL a 35 °C por 24 horas.

Confirmação: - Ágar nutri a 35 °C por 24 horas

- Sorotipagem.

b) - placas XLD, SS e EMB a 35 °C por 24 horas.

- Meio IAL a 35 °C por 24 horas.

Confirmação: - Placa ágar nutri a 35 °C por 24 horas.

- Sorotipagem.

##### 4.10.3.3 *Escherichia coli*

Amostra 1 diluir 1:10 em caldo lauril triptose a 44,5 °C por 24 horas

Placa ágar McConkey e EMB; caldo EC e bile a 44,5 °C por 24 horas.

Meio IAL a 35 °C por 24 horas.

Meio IMViC a 35 °C por 24 horas.

#### 4.10.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Amostra 2 a 35 °C por 48 horas

Placa ágar cetrimide a 35 °C por 24 horas

Prova de Oxidase

#### 4.10.3.5 *Staphylococcus aureus*

Amostra 2 a 35 °C por 48 horas

Placa ágar BP a 35 °C por 24 horas.

Confirmação: BHI, Catalase, DNase, Coagulase.

### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A metodologia usada foi Análise de Variância. Os testes estatísticos de significância utilizados para comparação de médias foram o Teste “t” na comparação de dois tratamentos e o DMS-Teste, sempre que o teste de significância da Anova comprove haver diferenças nos níveis de probabilidade de 95 e 99%.

Foram realizadas análise de variância do delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (1- temperatura de secagem a 40 °C, 2- idem 50 °C, 3- idem 60 °C, 4- idem 70 °C, 5- idem 80 °C e 6- temperatura usada pelo beneficiador), em triplicadas para os seguintes parâmetros: a) polifenóis totais, b) não tanantes, c) taninos e d) flavonoides. Na comparação de médias para estes parâmetros em que o F-teste informa haver diferenças estatísticas foi usado o teste adicional de significância (DMS-teste).

Para comparação de dois processos de determinação de umidade pelo método do infravermelho e por dessecação foi utilizada a metodologia do Teste de Student (Teste “t”) para os parâmetros: 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C e Rotina.

Na análise da atividade antioxidante foram utilizados os seis parâmetros de 40 °C a 80 °C, Rotina e mais duas substâncias de referência: o ácido ascórbico e a rutina, todos em triplicata no delineamento inteiramente casualizado e após comprovação de significância pelo F-teste da ANOVA será usado o DMS-teste.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MEDIDAS DE TEMPERATURAS DE SECAGEM

Os resultados apresentados nas tabelas 2 a 7 mostram as leituras das temperaturas nos quatro sensores distribuídos internamente no secador para a secagem de ramos e folhas de espinheira-santa. O 1º sensor encontrava-se posicionado mais distante da fonte de aquecimento numa parede sem aberturas, ao fundo do secador. O 2º e 3º sensores foram locados perto da fonte de aquecimento, sendo o 2º ao lado da porta 1 de abastecimento do secador e o 3º sensor estava ao fundo do secador, num local sem aberturas, porém perto da fonte de calor. O 4º sensor foi posicionado ao lado da porta 2 de abastecimento mais distante da fonte de calor.

TABELA 2 - TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 40 °C

TEMPO (h)	TEMPERATURA NO SENSOR (°C)				MÉDIA/HORA
	1	2	3	4	
0	25,8	20,9	24,5	21,3	23,1
1	23,7	24,3	26,3	31,0	26,3
2	51,8	50,0	42,7	48,1	48,2
3	46,8	47,1	43,3	46,6	46,0
4	46,5	47,3	47,7	46,9	47,1
5	46,2	47,6	42,2	48,0	46,0
6	44,0	44,6	40,3	45,0	43,5
7	43,4	44,7	40,3	45,1	43,4
8	43,4	45,6	40,8	45,9	43,9
9	44,9	46,4	41,6	46,5	44,9
10	42,5	43,2	40,9	43,3	42,5
11	43,5	44,6	41,6	44,8	43,6
12	42,1	43,2	42,8	43,3	42,9
13	47,0	48,7	44,7	48,0	47,1
14	44,6	43,1	43,7	43,1	43,6
15	41,2	40,6	40,4	40,9	40,8
16	42,9	42,9	41,6	44,5	43,0
17	45,5	45,0	42,8	45,1	44,6
18	42,3	40,1	41,7	42,4	41,6
Média/sensor	43,5	43,8	41,4	44,4	43,3

No início da secagem, aproximadamente nas três primeiras horas as portas permaneciam abertas, devido ao grande volume de água retirada da planta e que se acumulava no teto e nas paredes, esgotando a capacidade de retirada da umidade pelo exaustor. Após esse período de grande evaporação, quando se observava as paredes e tetos praticamente secos, as portas do secador eram fechadas.

O controle do aquecimento era executado manualmente, por meio de abastecimento da serragem para manter a temperatura desejada, em função desse fator, ocorreram variações no aquecimento durante o processo de secagem.

TABELA 3 - TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 50 °C

TEMPO (h)	TEMPERATURA NO SENSOR (°C)				MÉDIA/HORA
	1	2	3	4	
0	22,6	23,2	23,0	23,4	23,1
1	39,9	41,7	41,7	42,2	41,4
2	47,5	49,5	47,6	48,1	48,2
3	52,0	53,9	52,0	52,5	52,6
4	52,0	53,4	51,7	52,7	52,4
5	52,0	52,9	51,3	52,6	52,2
6	53,3	54,3	52,5	54,0	53,5
7	53,7	54,2	53,0	53,7	53,7
8	53,1	53,4	52,3	52,8	52,9
9	53,5	54,0	52,5	52,8	53,2
10	51,6	51,6	50,4	51,2	51,2
11	51,7	51,5	50,5	50,9	51,2
12	51,2	50,7	49,7	51,0	50,7
Média/sensor	51,0	51,7	50,4	51,2	51,1

TABELA 4 - TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 60 °C

TEMPO (h)	TEMPERATURA NO SENSOR (°C)				MÉDIA/HORA
	1	2	3	4	
0	25,8	25,6	23,9	24,3	24,9
1	53,8	55,1	53,0	56,6	54,6
2	61,3	65,9	62,6	66,2	64,0
3	59,1	59,8	57,9	60,3	59,3
4	59,9	61,1	59,9	61,2	60,5
5	61,2	62,0	60,9	62,2	61,6
6	62,5	63,3	61,7	63,5	62,8
7	65,5	67,2	65,4	67,5	66,4
8	65,0	64,8	64,3	65,1	64,8
9	60,3	59,9	59,1	60,1	59,9
Média/sensor	61,0	62,1	60,5	62,5	61,5

TABELA 5 - TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 70 °C

TEMPO (h)	TEMPERATURA NO SENSOR (°C)				MÉDIA/HORA
	1	2	3	4	
0	22,2	22,5	21,3	20,6	21,7
1	46,3	47,7	46,0	47,0	46,8
2	52,0	55,2	53,9	54,9	54,0
3	52,3	52,4	50,2	51,7	51,7
4	66,4	67,0	68,8	68,8	67,8
5	64,5	70,0	67,4	70,2	68,0
6	70,0	74,5	71,4	75,0	72,7
7	72,8	76,6	73,8	76,2	74,9
Média/sensor	60,6	63,3	61,6	63,4	62,3

TABELA 6 - TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM A 80 °C

TEMPO (h)	TEMPERATURA NO SENSOR (°C)				MÉDIA/HORA
	1	2	3	4	
0	22,7	19,4	22,5	21,1	21,4
1	52,4	59,1	53,4	51,2	54,0
2	65,5	75,0	66,8	63,5	67,7
3	65,8	76,0	68,7	67,8	69,6
4	73,0	81,1	75,3	74,7	76,0
5	79,5	86,5	82,2	80,9	82,3
6	83,1	86,2	86,0	85,6	85,2
Média/sensor	69,9	77,3	72,1	70,6	72,5

TABELA 7 - TEMPERATURAS NOS SENSORES NA SECAGEM DE ROTINA.

TEMPO (h)	TEMPERATURA NO SENSOR (°C)				MÉDIA/HORA
	1	2	3	4	
0	27,0	26,8	27,0	27,2	27,0
1	51,7	56,0	53,5	54,3	53,9
2	61,0	66,4	64,1	65,6	64,3
3	63,9	68,6	66,2	67,9	66,7
4	65,2	69,7	68,4	69,0	68,1
5	78,7	87,8	84,4	86,4	84,3
6	75,0	82,1	79,6	80,9	79,4
7	82,1	90,3	87,5	89,1	87,3
Média/sensor	68,2	74,4	72,0	73,3	72,0

As médias das temperaturas nos sensores revelaram uma menor temperatura no sensor 3 (figura 10 p. 35), nas secagens de 40 °C, 50 °C e 60 °C e, nas temperaturas de 70 °C, 80 °C e na rotina as menores temperaturas se deram no sensor 1 (figura 10 p. 35). Para uniformização da secagem era realizado um revolvimento das plantas durante o processo.

## 5.2 TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM DA ESPINHEIRA-SANTA

As tabelas 8 a 13 apresentam os teores de umidade nas folhas de espinheira-santa seca nas temperaturas de 40 a 80 °C e na rotina de secagem de um produtor realizada por perda por dessecação e em balança com infravermelho.

TABELA 8 - TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 40 °C

TEMPO (h)	TEOR DE UMIDADE (%)	
	Perda por Dessecação	Infravermelho
0	51,44	51,29
1	49,97	49,94
2	47,22	48,11
3	43,49	43,64
4	39,75	40,54
5	38,57	39,22
6	34,84	35,98
7	30,94	31,71
8	28,72	28,98
9	26,17	26,58
10	23,62	24,18
11	23,28	24,09
12	16,07	17,10
13	14,91	15,09
14	13,76	14,97
15	12,13	13,09
16	7,52	8,27
17	6,72	7,90
18	5,91	6,73

TABELA 9 - TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 50 °C

TEMPO (h)	TEOR DE UMIDADE (b)	
	Perda por Dessecação	Infravermelho
0	53,01	53,38
1	51,00	51,42
2	39,15	39,29
3	35,73	36,52
4	28,55	30,46
5	21,37	21,62
6	15,21	15,79
7	11,84	12,62
8	6,54	7,75
9	6,11	7,22
10	5,83	6,76
11	5,68	6,50
12	5,53	6,33



TABELA 10 - TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 60 °C

TEMPO (h)	MEDIDA DE UMIDADE (%)	
	Perda por Dessecação	Infravermelho
0	51,60	51,70
1	48,53	48,84
2	42,63	43,77
3	39,21	39,57
4	38,74	39,20
5	32,19	32,52
6	12,27	13,07
7	5,86	7,01
8	4,65	6,10
9	4,59	6,05

TABELA 11 - TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 70 °C

TEMPO (h)	TEOR DE UMIDADE (%)	
	Perda por Dessecação	Infravermelho
0	46,76	47,95
1	39,78	41,19
2	39,26	39,52
3	33,48	34,51
4	23,95	24,83
5	14,43	15,15
6	10,38	11,51
7	3,36	4,83

TABELA 12 - TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM A 80 °C

TEMPO (h)	TEOR DE UMIDADE (%)	
	Perda por Dessecação	Infravermelho
0	46,86	47,67
1	43,61	44,35
2	31,16	31,99
3	15,05	16,18
4	10,12	11,37
5	4,29	5,69
6	3,04	4,82

TABELA 13 - TEOR DE UMIDADE NA SECAGEM DE ROTINA

TEMPO (h)	TEOR DE UMIDADE (%)	
	Perda por Dessecação	Infravermelho
0	43,51	44,21
1	42,22	42,83
2	37,41	38,23
3	19,74	20,66
4	11,50	12,18
5	8,25	9,63
6	6,85	8,34
7	5,20	7,39

Para análise dos resultados foi utilizado programa estatístico MSTATC (KOEHLER, 1996). As análises estatísticas (tabela 14) mostraram que as metodologias de análise de umidade, em perda por dessecação ou em analisador por infravermelho não mostraram diferença significativa em nível de 1% de probabilidade nas seis temperaturas de secagens, demonstrando que o ensaio em analisador de umidade por infravermelho é viável e superior estatisticamente para plantas medicinais. O equipamento é de porte pequeno, podendo ser instalado nos locais próximos onde se processa a secagem, devendo sempre ter o cuidado de instalar em local livre de vibrações e sem corrente de ar, pois o mecanismo de funcionamento é de uma balança de precisão acoplada a um sistema de aquecimento por infravermelho. O processo de secagem nos produtores e/ou beneficiadores de plantas medicinais normalmente não é acompanhado com análises de umidade, sendo extremamente importante o conhecimento da umidade residual para cada espécie de planta, evitando deteriorações e crescimento de microorganismos.

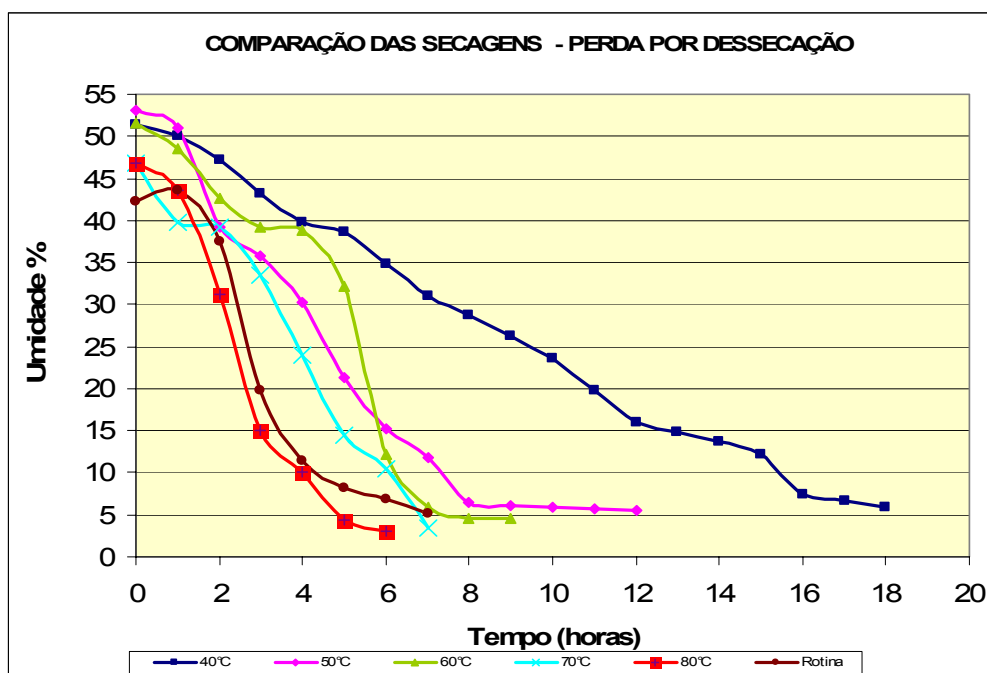
TABELA 14 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

TEMPERATURA DE SECAGEM	MÉDIA DAS UMIDADES (%)		TESTE "t"
	Perda por Dessecação	Infravermelho	
40 °C	27,11	27,76	6,93 **
50 °C	21,96	22,74	5,99 **
60 °C	28,03	28,78	4,69 **
70 °C	26,42	27,44	7,27 **
80 °C	22,02	23,16	7,71 **
Rotina	21,83	22,93	5,67 **

NOTA: \*\* - Muito significativo a 1% de probabilidade

O tempo decorrido para o processo de secagem é importante para o produtor/beneficiador, pois há gasto de energia, com pessoal e maior ocupação do secador. Dessa forma, o menor tempo gasto no processo é financeiramente vantajoso. Nas temperaturas de secagem de 40, 50, 60, 70, 80 °C e na rotina os tempos gastos foram de 18, 12, 9, 7, 6 e 7 horas respectivamente para o processo inteiro.

FIGURA 13 - TEMPO E CURVAS DE SECAGEM NAS DIFERENTES TEMPERATURAS



A 40 °C a curva de secagem teve um declínio lento e gradual, os períodos I e II, de velocidade constante e velocidade decrescente descritos em literaturas praticamente não foram observados. Nessa temperatura a retirada de água da planta é lenta e a evaporação que ocorre na superfície da planta, consegue manter um ritmo praticamente constante de difusão interna de água.

A 50 °C a curva apresentou um estágio prévio de umidade praticamente sem variação e em seguida o período de velocidade constante até a 6ª hora. A inclinação da reta nesse período foi bem mais acentuada que à temperatura de 40 °C com um tempo menor até atingir uma umidade  $\leq 6\%$ . Foi observada a amostra seca a 40 °C em 6 horas de secagem, que apresentou índices de umidade de 35%,

enquanto que a 50 °C o valor da umidade foi de 15%, uma diferença de 20% na retirada de água com um aumento de 10 °C.

A 60 °C a taxa de velocidade constante permaneceu até a 6ª hora, como na secagem a 50 °C e a partir daí houve uma diminuição característica de II período. A 70 °C praticamente a secagem inteira foi à velocidade constante, com uma inclinação mais acentuada que as temperaturas menores. A 80 °C pode-se observar um estágio inicial na primeira hora de aquecimento da planta, seguido pela taxa constante até a 3ª hora, e finalmente diminuído a velocidade.

A secagem de rotina do produtor mostrou os estágios característicos de uma curva teórica, com período inicial na 1ª hora, estágio I de velocidade constante até a 4ª hora e estágio II de velocidade decrescente. No final tendendo ao platô após umidade de 5%.

### 5.3 ATIVIDADE DE ÁGUA

As folhas de espinheira-santa seca nas temperaturas de 40 °C a 80 °C e na rotina do produtor apresentaram resultados que variaram de 0,638 a 0,534 (tabela 15), onde as temperaturas de secagem mais altas resultaram em menor atividade de água. Para os resultados obtidos não há quantidade suficiente de água disponível para crescimento bacteriano e de leveduras; pouca probabilidade de crescimento de outros fungos e de atividade enzimática, porém encontra-se numa faixa ótima para reações hidrolíticas, escurecimento enzimático e oxidação de lipídeos.

Antes de realizar o teste de atividade de água, foram efetuadas novas determinações de umidade, tendo sido encontrados os valores relacionados na tabela 15. As secagens aconteceram nos meses de janeiro a março iniciando por 40 °C e seguindo as temperaturas maiores sucessivamente e a análise de atividade de água foi realizada no mês de junho, dessa maneira, foram três a seis meses de armazenamento da planta. Dentro desse período o teor de umidade aumentou nas folhas de espinheira-santa, fato que está de acordo com REIS e SILVA (2004) que cita a umidade em torno de 8 a 12% após armazenamento. PESSUTO (2006) obteve a umidade de 10,92% após a secagem em temperatura ambiente.

Os parâmetros de análise foram: atividade da água destilada de 1,002, estando abaixo do valor especificado pelo fabricante, de no máximo 1,003. A

temperatura da água pura no momento do teste foi de 20,8 °C e a temperatura de análise de 21,5 °C.

TABELA 15- ATIVIDADE DE ÁGUA E TEOR DE UMIDADE DA ESPINHEIRA-SANTA SECA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

TEMPERATURA DE SECAGEM	ATIVIDADE DE ÁGUA (Aa±DP)	UMIDADE APÓS 3/6 MESES (%)	UMIDADE AO FINAL DA SECAGEM (%)
40 °C	0,638 ± 0,006	9,35	5,91
50 °C	0,633 ± 0,009	11,49	5,53
60 °C	0,654 ± 0,004	11,10	4,60
70 °C	0,537 ± 0,012	7,28	3,36
80 °C	0,534 ± 0,011	6,87	3,04
Rotina	0,547 ± 0,005	6,26	5,20

## 5.4 POLIFENÓIS

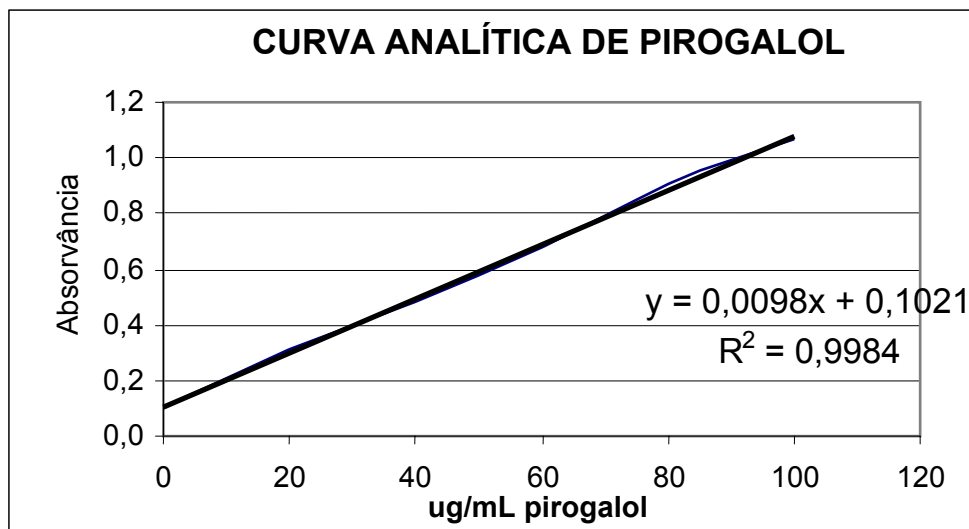
### 5.4.1 Polifenóis Totais e Taninos (REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA, 1981).

O método utiliza o reativo de Folin-Denis (fosfotúngstico) que forma um complexo instável com os polifenóis, dessa maneira o tempo para a análise é crítico. O doseamento de taninos acontece de forma indireta, onde se quantifica a partir da SM os polifenóis totais e posteriormente se processa a reação com pó-de-pele cromada para a complexação dos taninos, que são retirados da amostra por filtração. Pela diferença entre os polifenóis totais e os não-tanantes obtém-se o teor de taninos. A metodologia utiliza como seqüestrante de taninos, o pó-de-pele em menor quantidade que a metodologia preconizada pela OMS no doseamento de taninos em plantas medicinais (WHO, 1998).

A equação da reta  $Y = 0,0098x + 0,1021$  obtida da curva analítica de pirogalol (figura 14) permitiu o cálculo dos teores de polifenóis totais e taninos expressos em mg% de pirogalol nas amostras de espinheira-santa.

A figura 15 apresenta resultados para os polifenóis totais e taninos nas diferentes temperaturas de secagem das folhas de espinheira-santa. O seu teor variou no intervalo de:  $5,36 \pm 0,43$  a  $8,38 \pm 0,30$  mg% para polifenóis totais e  $3,43 \pm 0,30$  a  $4,71 \pm 0,24$  mg% de taninos.

FIGURA 14 - CURVA ANALÍTICA DE PIROGALOL

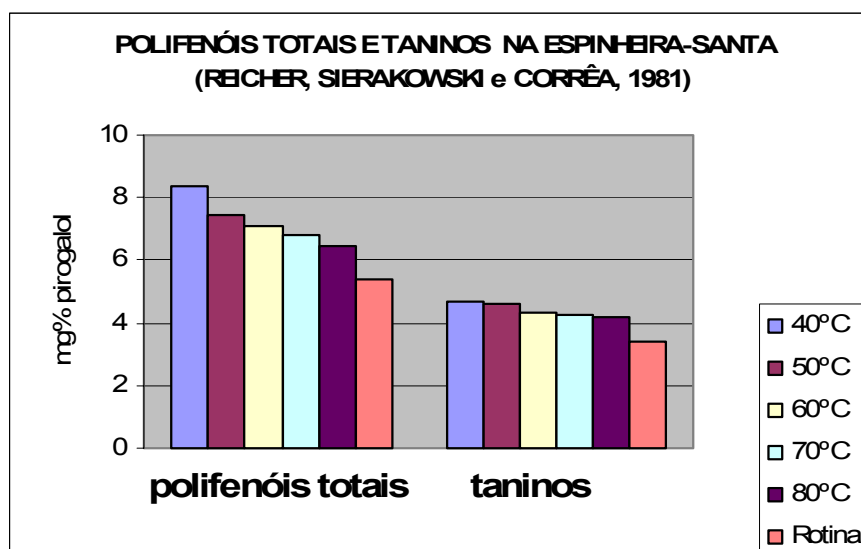


Os resultados dos teores de polifenóis totais e taninos diminuíram com o aumento da temperatura de secagem, tendo a amostra seca à temperatura de 40 °C apresentado os maiores teores para ambos.

Os valores encontrados de polifenóis totais e taninos estão dentro das especificações da Farmacopéia Brasileira IV (2003) que cita valores específicos para a espinheira-santa de no mínimo 2% de taninos totais, que devem conter no mínimo 4% de fração não-tanante e 5% de fração tanante. Os resultados encontrados também estão de acordo com NASCIMENTO et al.<sup>5</sup> citado por SCHEFFER, CORREA JUNIOR e GRAÇA (2004), que obtiveram os valores de 2,5 a 4,5% de taninos nas folhas; MARTINS, GUTERRES e GONZALEZ ORTEGA (2003) de 8,72 g%, 5,61 g% e 3,11 g% de polifenóis totais, polifenóis não-tanantes e taninos respectivamente em análise realizada segundo a Farmacopéia Alemã, que utiliza a caseína para a complexação e pirogalol como substância referência. PESSUTO (2006) obteve 5,05% para taninos totais doseado pelo método de Folin-Ciocalteau e utilizando o pó-de-pele para a complexação de taninos. SILVA et al.<sup>6</sup> citado por RADOMSKI (1998), de 5,4 a 8,7% e 3,3 a 4,9% de polifenóis totais e taninos respectivamente nas folhas de espinheira-santa, enquanto que ficaram abaixo dos valores encontrados por RADOMSKI (1998) de 10,3%, 2,2% e 8,1% para polifenóis totais e polifenóis não-tanante e taninos respectivamente nas folhas de espinheira-

santa cultivada a pleno sol e determinado pela metodologia de REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA (1981), utilizando o ácido tânico como substância referência.

FIGURA 15 - TEORES DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS PELO MÉTODO REICHER, SIERAKOWSKI e CORREA (1981).



NOTA: Valores especificados na tabela 19.

#### 5.4.2 Taninos Totais, Fração Não-tanante e Fração Tanante (FB IV, 2003)

O método descrito pela FB utiliza a caseína para a complexação da fração tanante (taninos) substituindo pó-de-pele cromada. As equações descritas para o cálculo requerem a determinação do teor de umidade da planta (m) e não é especificada a unidade usada.

<sup>5</sup> NASCIMENTO, T.S.R.S.; DALLAGNOLL, L.; SCHULZ, M.C. Avaliação da interferência de talos no doseamento de taninos e pesquisa por CCD de friedelina em folhas de *Maytenus ilicifolia* Martius (Celastraceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Resumos**. Cuiabá: SPMB, 2002. CD-ROM.

<sup>6</sup> SILVA, C.G.; REGIO, R.A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; PAIVA, R.L.R. Coleta e avaliação da qualidade fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* M. (Espinheira-santa). **Tribuna Farmacêutica**, v.57/59, p.46-50, 1991.

Segundo a FB IV (2000) a determinação de água é dada em % de água em relação à droga seca. Se partir desse resultado em %, na equação 1 se tem (m-p), ou seja, [teor umidade (%)] - peso da droga (g)]:

#### Equações 1

$$(a) A^{1\%} = \frac{A_3 \times 10}{c}$$

$A^{1\%}$ : Absorvância específica da solução  
referência

$A_3$ : Absorvância medida para a substância  
referência

c: concentração em mg/mL

TT: Taninos totais em (%) (p/p)

FD: 12.500

$$(b) TT = \frac{FD \times A_1}{(m-p) \times A^{1\%}}$$

$A_1$ : Absorvância medida para taninos totais

m: determinação de água

p: peso da droga (g)

$$(c) NT = \frac{FD \times A_2}{(m-p) \times A^{1\%}}$$

NT: Fração não tanante em % (p/p)

$A_2$ : Absorvância medida para taninos não  
precipitáveis

$$(d) FT = TT - NT$$

FT: Fração tanante em % (p/p)

Substituindo os dados requeridos na equação 1, foram encontrados os valores descritos na tabela 16.

MARTINS, GUTERRES e ORTEGA (2003) realizaram o doseamento de taninos em *Maytenus ilicifolia* segundo o doseamento de polifenóis totais e taninos descritos na Farmacopéia Alemã (DAB-9) <sup>7</sup>, sendo apresentadas as seguintes equações (equação 2):

<sup>7</sup> DAB-9 - Deutsches Arzneibuch. 9 Auf. (1986) Frankfurt: Govi: Stuttgart: Deutscher Apotheker.



TABELA 16 - TEOR DE TANINOS PELA METODOLOGIA DA FB IV (2003).

TEMPERATURA SECAGEM	UMIDADE (%)	TT (%±DP)	NT (%±DP)	FT (%±DP)
40 °C	9,35	0,55 ± 0,015	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,01
50 °C	11,49	0,40 ± 0,029	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,02
60 °C	11,10	0,38 ± 0,020	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,01
70 °C	7,28	0,59 ± 0,014	0,32 ± 0,02	0,27 ± 0,02
80 °C	6,87	0,61 ± 0,040	0,33 ± 0,02	0,28 ± 0,04
Rotina	6,26	0,66 ± 0,033	0,35 ± 0,01	0,32 ± 0,02

NOTA: TT = taninos totais (polifenóis totais)

NT = fração não tanante

FT = fração tanante (taninos)

## Equação 2

$$(a) PT = \frac{FD \times A_1}{(m - p) \times A^{1\%}}$$

$A^{1\%}$ : Absorvância específica do pirogalol = 1714

PT: Polifenóis Totais em % (p/p)

FD: 12.500

m: peso da droga (g)

p: perda por dessecação na massa (g)

$A_1$ : Absorvância para taninos totais

$$(b) NT = \frac{FD \times A_2}{(m - p) \times A^{1\%}}$$

NT: Fração não-tanante em % (p/p)

$A_2$ : Absorvância para taninos não precipitáveis

$$(c) TT = PT - NT$$

TT: Taninos Totais em % (p/p).

Quando comparadas as equações 1 e 2, observa-se que na FB a denominação de m é determinação de água e p, peso da droga (g). Segundo a DAB-9 as denominações são invertidas, sendo m, o peso da droga (g) e p, a perda por dessecação (g).

Foram efetuados os cálculos invertendo m por p nas equações descritas na FB, e os resultados encontram-se na tabela 17.

TABELA 17 - TEOR DE TANINOS NA ESPINHEIRA-SANTA PELA MEDOLOGIA DA FB IV (2003).

TEMPERATURA DE SECAGEM	TT (%±DP)	FT (% ±DP)
40 °C	7,01±0,19	3,39±0,14
50 °C	6,50±0,47	3,09±0,30
60 °C	5,96±0,31	2,87±0,11
70 °C	5,56±0,13	2,54±0,18
80 °C	5,39±0,35	2,49±0,37
Rotina	5,20±0,25	2,49±0,19

Se forem aplicadas as equações 2 para os cálculos, tomando como base as absorvâncias medidas, os resultados obtidos são os apresentados na tabela 18.

TABELA 18 – POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS SEGUNDO A FARMACOPÉIA ALEMÃ (DAB-9)

TEMPERATURA SECAGEM	DAB - 9	
	PT (%±DP)	TANINOS (%±DP)
40 °C	8,172 ± 0,28 a	3,926 ± 0,16 a
50 °C	7,476 ± 0,43 b	3,582 ± 0,35 ab
60 °C	6,908 ± 0,35 c	3,326 ± 0,12 bc
70 °C	6,500 ± 0,23 cd	2,936 ± 0,21 c
80 °C	6,210 ± 0,26 d	2,884 ± 0,43 c
Rotina	5,990 ± 0,32 d	2,886 ± 0,22 c

NOTA: Média de mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de DMS em nível de 1% de probabilidade.

Os resultados segundo a DAB-9, a FB IV (2003) e REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA (1981), apresentados na tabela 19 mostram uma similaridade entre os resultados de REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA (1981) e DAB-9 do que aqueles obtidos pela metodologia da FB, pois neste, mesmo as absorvâncias sendo crescentes, os valores obtidos eram menores e variavam. Os resultados segundo a DAB-9 e REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA (1981) mostraram-se proporcionais às absorvâncias medidas.

A análise estatística a 1% de probabilidade nos experimentos realizados segundo a Farmacopéia Alemã mostrou a temperatura de 40 °C muito significativa e com um coeficiente de variação de 4,65% para o doseamento de polifenóis totais enquanto que para a análise de taninos o grupo de maior significância está representado pela temperatura de secagem de 40 e 50 °C e um CV de 8,31%.

TABELA 19 – COMPARAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E TANINOS POR TRÊS REFERÊNCIAS DIFERENTES

TEMPERATURA SECAGEM	FB IV(2003)		DAB - 9		REICHER, SIERAKOWSKI E CORRÊA (1981)	
	TT	Fração Tanante	PT	Taninos	PT	Taninos
40 °C	0,55	0,27	8,172 a	3,926 a	8,373 a	4,847 a
50 °C	0,40	0,19	7,476 b	3,582 ab	7,433 b	4,590 ab
60 °C	0,38	0,18	6,908 c	3,326 b	7,100 bc	4,337 b
70 °C	0,59	0,27	6,500 d	2,936 c	6,823 cd	4,240 b
80 °C	0,61	0,28	6,210 d	2,886 c	6,427 d	4,207 b
Rotina	0,66	0,32	5,990 d	2,884 c	5,360 e	3,430 c

NOTA: Média de mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de DMS ao nível de 1% de probabilidade.

O doseamento segundo REICHER, SIERAKOWSKI e CORRÊA (1981) para polifenóis totais apresentou a secagem na temperatura de 40 °C estatisticamente diferente para o teste F da ANOVA e apresentando superioridade no DMS teste, com um CV de 2,38 %. Para os taninos, as secagens de 40 e 50 °C formaram o 1º grupo de significância comprovando a superioridade e com coeficiente de variação de 4,23%.

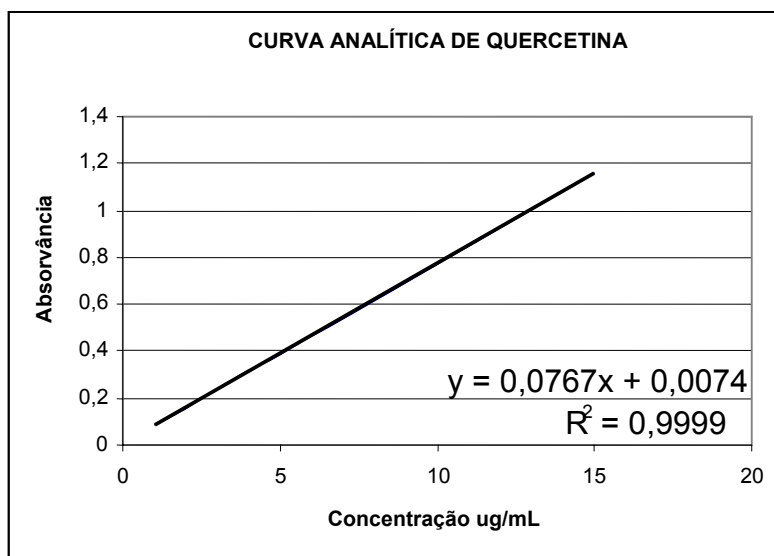
#### 5.4.3 Flavonóides

Os flavonóides presentes nos vegetais desempenham várias funções, de pigmentos coloridos nas flores à proteção contra radiações ultravioleta, mas o grande interesse que tem despertado aos seres humanos é devido ao potencial benéfico no combate e prevenção de doenças. Os flavonóides são muito reativos e facilmente oxidáveis podendo sofrer alterações por diversos fatores, entre eles, o processamento pós-colheita (ROBARDS et al., 2003).

O método de complexação entre cloreto de alumínio e os flavonóides determinam um efeito batocrômico e é detectado por espectrofotometria em UV em 425 nm, quantificando as substâncias flavônicas em geral ou um grupo deles.

A figura 16 apresenta a curva analítica da substância referência, quercetina, no doseamento de flavonóides.

FIGURA 16 – CURVA ANALÍTICA DE QUERCETINA



A equação da reta  $Y = 0,0767x + 0,0074$  dada pela curva analítica acima permitiu o cálculo da concentração de flavonóides contidos nas folhas de espinheira-santa em mg% de quercetina.

A tabela 20 mostra a concentração de flavonóides nas folhas de espinheira-santa segundo a curva analítica da quercetina e pela equação descrita na monografia de barbatimão na FB. A curva analítica de quercetina foi adicionalmente realizada pelo doseamento estar incluído na monografia de outra espécie de planta, onde constam fatores nas equações de cálculo, dessa maneira, encontram-se dispostos na tabela abaixo os dois valores obtidos. O doseamento de flavonóides segundo a metodologia da FB apresentou um valor maior que os resultados dos teores pela curva analítica.

A análise estatística para o doseamento de flavonóides nas folhas de espinheira-santa apresentou a temperatura de secagem de 40 °C e 50 °C significativamente superior às outras temperaturas, com um CV de 1,22%.

TABELA 20 - TEOR DE FLAVONÓIDES NAS FOLHAS DE ESPINHEIRA-SANTA SEGUNDO FB

AMOSTRA	TEOR DE FLAVONÓIDES (mg%) DE QUERCETINA	
	Curva analítica	Equação FB
40 °C	1,72±0,01 a	2,93±0,02
50 °C	1,68±0,01 b	3,14±0,34
60 °C	1,35±0,01 c	2,35±0,02
70 °C	1,27±0,02 d	2,13±0,03
80 °C	1,17±0,03 e	1,94±0,05
ROTINA	1,16±0,03 e	1,91±0,05

NOTA: Média de mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de DMS em nível de 1% de probabilidade

## 5.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

As plantas contêm uma grande quantidade e variedade de substâncias químicas com atividade antioxidante contra os radicais livres formados ou ingeridos pelo organismo. *Maytenus ilicifolia* apresenta entre os fitocomplexos que a constitui, os polifenóis, como taninos e flavonóides, os quais são tidos como bons antioxidantes, porém os polifenóis são substâncias que variam grandemente na sua estrutura. Devido esta complexidade apresentada pelos fitoquímicos é necessário fazer a avaliação da capacidade antioxidante da planta pelo menos por dois métodos (CHOI et al., 2002).

### 5.5.1 Método Fosfomolibdênio

O método baseado na redução de Molibdênio (VI) a Molibdênio(V) é considerado de baixo custo, simples e utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total de uma amostra, porém durante a execução alguns cuidados devem ser tomados para se obter um resultado confiável, como, controle adequado da temperatura, tempo de reação e o fechamento hermético dos tubos de reação para evitar evaporação do solvente e a concentração da amostra, finalizando em resultados mais elevados. A tabela 21 apresenta a capacidade antioxidante das folhas de espinheira-santa pelo método fosfomolibdênio. O ácido ascórbico é uma substância referência, considerado como 100% de capacidade antioxidante.

Os resultados mostram que na secagem a 40 °C e 50 °C verificaram-se os maiores valores da capacidade antioxidante e o menor valor para a secagem a 80 °C, revelando que a capacidade antioxidante da planta foi afetada pelas temperaturas mais elevadas. Em relação à substância referência rutina, que é um derivado glicosilado da quercetina, as folhas de espinheira-santa tiveram maior capacidade antioxidante em todas as temperaturas de secagem, revelando que a planta é uma fonte de substâncias antioxidantes. PESSUTO (2006) obteve 30% e 70% de atividade antioxidante para o extrato bruto e para a fração acetato de etila, respectivamente, .

TABELA 21 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIV. ANTIOX. (%± DP)	DMS -teste (95%)
Padrão Acido Ascórbico	100,00 ± 0,27	a
40 °C	36,993 ± 0,31	b
50 °C	36,280 ± 0,67	bc
60 °C	35,160 ± 0,10	c
70 °C	34,620 ± 0,12	c
80 °C	28,930 ± 1,14	e
Rotina	31,643 ± 1,03	d
Padrão Rutina	24,933 ± 1,18	f

NOTA: Média de mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de DMS em nível de 1% de probabilidade.

A capacidade antioxidante está estreitamente ligada aos polifenóis, tanto para taninos como para os flavonóides que são tidos como bons antioxidantes. Os resultados obtidos pela metodologia do fosfomolibdênio demonstraram que ocorreu menor poder antioxidante na temperatura de secagem de 80 °C que na secagem de rotina do produtor e as temperaturas de 40 °C e 50 °C apresentaram maior poder antioxidante. Essa metodologia de extração requer uma concentração conhecida do extrato da amostra (200 µg/mL), enquanto que para determinação de polifenóis totais, taninos e flavonóides, a extração é feita diretamente das folhas trituradas, antecedendo as análises (item 4.8, p. 37 e 4.9, p. 38).

#### 5.5.2 Atividade Antioxidante pela Redução do DPPH (2,2,difenil-1-hidrazila)

O método desenvolvido por BLOIS (1958) é baseado na redução do radical estável DPPH<sup>•</sup> com diminuição proporcional à formação DPPH-H e alteração da cor

violeta para o amarelo medido espectrofotometricamente em 517 nm. Cada substância apresenta uma velocidade de reação dependendo do seu conteúdo em agentes antioxidantes, podendo ter uma cinética rápida (até cinco minutos), intermediário (cinco a trinta minutos) e lento (mais de trinta minutos). De acordo com a classificação de BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995) a espinheira-santa apresenta uma cinética de reação intermediária, com um tempo de trinta minutos para a descoloração máxima de DPPH. Esse tempo de reação é semelhante para muitos vegetais considerados bons antioxidantes, como brócolis e agrião (ARBOS, 2004).

#### 5.5.2.1 IC<sub>50</sub> das amostras e poder antiradical

▪ O IC<sub>50</sub> é um parâmetro usado para determinar o potencial antioxidante das plantas. Ele demonstra a quantidade necessária da planta para reduzir em 50% o DPPH, simulando assim como a planta atuará em um radical livre no organismo. Quanto maior o IC<sub>50</sub>, maior será a quantidade necessária de substância para exercer a atividade antioxidante, dessa forma, um baixo IC<sub>50</sub> significa que a planta tem um grande poder antioxidante. Para a elaboração do gráfico de % Atividade antioxidante x concentração foram efetuados os cálculos da atividade antioxidante para cada concentração através da equação  $\% \text{ Ativ. Antiox.} = 100 - (\text{absorvância amostra} - \text{absorvância branco}) \times 100 / \text{absorvância controle}$ .

Para o cálculo do IC<sub>50</sub>, utilizou-se a equação da reta, substituindo-se o valor de y por 50 para obter a concentração da amostra com capacidade para reduzir 50% do DPPH.

Os resultados das atividades antioxidante em folhas de espinheira-santa seca em diferentes temperaturas estão apresentados na tabela 22 através de IC<sub>50</sub> e do poder antiradical. O IC<sub>50</sub>, quantidade de antioxidante necessária para reduzir o radical DPPH em 50% da concentração inicial, significa que quanto maior o IC<sub>50</sub> menor a atividade antioxidante da amostra, enquanto que o poder antiradical expressa uma relação direta da atividade antioxidante.

TABELA 22 - IC<sub>50</sub> e PODER ANTIRADICAL DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA-SANTA

AMOSTRAS	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	PODER ANTIRADICAL (1/ IC <sub>50</sub> )
40 °C	4,02	0,248
50 °C	4,77	0,210
60 °C	5,88	0,170
70 °C	5,66	0,176
80 °C	7,07	0,141
Rotina	6,69	0,149
Rutina	3,12	0,320
AA (ácido ascórbico)	0,44	2,272

O valor obtido de IC<sub>50</sub> para a secagem a 40 °C, 4,02 µg/mL, quer dizer que são necessários 4,02 µg/mL de extrato etanólico de espinheira-santa para reduzir em 50% o DPPH, enquanto que a temperatura de secagem de 80 °C apresentou o maior valor de IC<sub>50</sub>, de 7,07 µg/mL, sendo necessário 7,07 µg/mL do extrato etanólico para que aconteça a redução e portanto uma atividade antioxidante bem menor que na secagem a 40 °C. A secagem de rotina do produtor revelou um valor menor de IC<sub>50</sub> que a secagem a 80 °C e em todas as temperaturas de secagem mostraram um IC<sub>50</sub> maior que a substância referência rutina e ácido ascórbico, e portanto menor atividade antioxidante em relação à redução do DPPH.

Considerando que o IC<sub>50</sub> é inversamente proporcional à atividade antioxidante, e poder antiradical diretamente proporcional, os valores obtidos foram menores na seguinte proporção: 40 °C > 50 °C > 70 °C > 60 °C > rotina > 80 °C.

## 5.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os microorganismos se encontram praticamente em todos os ambientes, ar, água e solo, podendo ser levados diretamente ou através do ar a outros lugares contaminando alimentos, plantas e animais. Encontrando condições adequadas para o crescimento e sobrevivência os microorganismos se instalam, sendo alguns potencialmente patogênicos aos seres humanos, principalmente pela produção de toxinas.

As enterobactérias são bacilos gram negativos que podem causar infecções urinárias, intestinais e septicemias pela produção de toxinas. *E. coli* é um bacilo



pertencente às enterobactérias, as quais possuem seis espécies enteropatogênicas, especialmente para crianças. *Salmonella* sp são bacilos gram negativos pertencentes às enterobactérias e são causadoras de enterocolites. *Pseudomonas aeruginosa* são bacilos gram negativos, oportunistas que pode causar infecções graves em humanos e em plantas (BIOCEN, 2007). *Staphylococcus aureus* são cocos gram positivos geralmente agrupados em cachos, não esporulados, muito resistentes, podendo permanecer meses em amostras secas, relativamente resistentes ao calor e a antibióticos e podem causar infecções letais (ANVISA, 2004). Os fungos podem ser divididos em bolores (forma filamentosa) ou leveduras (unicelular) ou mesmo dimórficos, em alguns patógenos (NASCIMENTO, 2003).

ANDRADE e ZELANTE (1989) avaliaram a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em 112 indivíduos assintomáticos e sadios e encontraram em 45% de presença em portadores nasais, 7,5% linguais, 10% manuais e 5% fecais. Encontraram ainda 24,8% de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas.

A tabela 23 apresenta o resultado da análise microbiológica em UFC/g (unidade formadora de Colônia por grama) efetuada nas folhas de espinheira-santa.

Segundo a OMS, os valores de contaminação microbiológica permitidos para plantas medicinais em UFC/g estão descritas no quadro 4.

TABELA 23 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA-SANTA

ANÁLISE	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	ROTINA
Contagem bactéria (UFC/g)	9,3.10 <sup>3</sup>	2,9.10 <sup>4</sup>	1,1.10 <sup>5</sup>	1,0.10 <sup>6</sup>	2,5.10 <sup>5</sup>	9,0.10 <sup>5</sup>
Fungos (UFC/g)	1,6. 10 <sup>4</sup>	2,2. 10 <sup>6</sup>	3,8.10 <sup>4</sup>	6,5.10 <sup>2</sup>	1,7.10 <sup>5</sup>	9,2.10 <sup>5</sup>
<i>E.coli</i> termotolerante (UFC/g)	< 3	3	< 3	4	7	< 3
Enterobactérias (UFC/g)	9	3	9	120	1,1.10 <sup>3</sup>	1,1.10 <sup>3</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>S. aureus</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

QUADRO 4 - LIMITES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM PLANTAS MEDICINAIS SEGUNDO OMS (WHO, 1998)

ANÁLISE	PARA USO EM INFUSÃO (UFC/g)	PARA USO INTERNO (UFC/g)
Contagem bactérias aeróbicas	$10^7$	$10^5$
Contagem bolores e leveduras	$10^4$	$10^3$
Contagem <i>Escherichia coli</i>	$10^2$	10
Contagem Enterobactérias	$10^4$	$10^3$
Pesquisa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência
Pesquisa <i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausência
Pesquisa <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausência

O resultado do teste microbiológico revelou presença de bactéria aeróbica variando de  $9,3 \cdot 10^3$  a  $1,0 \cdot 10^6$  UFC/g, valores dentro da especificação para uso como infusão, porém para uso interno, as amostras secas em temperaturas acima de 60 °C estavam acima do permitido pela OMS. Na análise de fungos somente a amostra seca a 70 °C apresentou-se níveis permitidos, enquanto que na contagem de *E. coli* todas as amostras estavam dentro do limite exigido. As temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C na contagem de enterobactérias mostraram condições adequadas, enquanto que a 80 °C e na rotina não apresentou qualidade suficiente para uso interno. As folhas de espinheira-santa seca nas diferentes temperaturas não apresentaram contaminação com *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e *Pseudomonas aeruginosa*. Das amostras avaliadas, somente a espinheira-santa seca a 70 °C apresentou nível de qualidade para uso como infusão, porém reprovada para uso interno. As amostras secas a 80 °C e na rotina apresentaram os maiores níveis de reprovação, na contagem de bactérias, enterobactérias e de fungos. O teste com maior reprovação foi contagem de fungos, com cinco reprovações num total de seis amostras mostrando que é a contaminação mais comum nesse local de colheita e/ou beneficiamento.

Os microorganismos que foram levados à planta através do solo, água ou durante a colheita poderiam estar sendo eliminados na secagem por meio de temperaturas mais altas, porém neste trabalho as temperaturas mais baixas apresentaram menores quantidades de microorganismos contaminantes, revelando assim que, as temperaturas elevadas podem não ser suficientes para livrar a planta de contaminações microbianas, podendo ocorrer contaminação após o processo de secagem, pela manipulação dos operadores, exposição da planta com materiais ou equipamentos contaminados e mesmo pelo ambiente ou pela exposição ao ar. As

análises microbiológicas revelaram que as amostras estavam bastante contaminadas, mesmo o produtor tomando alguns cuidados para evitar esse dano. Observou-se que no local de secagem havia banheiros disponíveis, limpos, água tratada e sabonete líquido para os manipuladores, os animais domésticos existentes eram mantidos longe dos secadores e as espécies de plantas diferentes mantidas em secadores distintos, mesmo assim ocorreram contaminações do material, indicando que plantas medicinais são bons veículos de carga microbiana e devem ser redobrados os cuidados após a secagem, evitando que o consumidor venha a sofrer danos decorrentes do seu uso.

Apesar da atividade de água apresentar resultados que não favoreciam o crescimento de microorganismos, as amostras analisadas revelaram uma carga microbiana acima do permitido pela OMS. Sugerem-se novas análises antes e após o processo de secagem para averiguar a qualidade da planta.

## 6 CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos pode-se concluir que:

A curva de secagem na temperatura de 40 °C apesar de ter apresentado o tempo mais longo, com a retirada da umidade lentamente, preservou melhor a qualidade da planta.

As análises de polifenóis totais e taninos não estão padronizadas para as folhas de espinheira-santa, o que dificultou a comparação dos resultados.

Houve variação decrescente dos teores de polifenóis totais em relação à mg% de pirogalol nas diferentes temperaturas de secagem, comprovando a influência destas sobre os polifenóis e para os taninos constatou-se que ocorreu esta variação em menor escala.

Os teores de flavonóides foram diminuindo à medida que a temperatura de secagem aumentava, mostrando que as temperaturas praticadas durante a secagem influenciam inversamente nos seus valores.

A atividade antioxidante efetuada por duas metodologias sofreu influência negativa da temperatura.

As contagens microbiológicas apresentaram valores acima do permitido pela OMS em todas as temperaturas de secagem avaliadas, caso a planta seja utilizada para uso interno. Os bolores e leveduras foram os microorganismos com maior nível de contaminação nas amostras avaliadas. As altas temperaturas utilizadas nas secagens não foram suficientes para evitar a contaminação microbiológica.

A quantificação de polifenóis e de atividade antioxidante mostrou que a temperatura influenciou nos teores finais, indicando que temperaturas elevadas afetam a qualidade final da planta e, não são suficientes para eliminar a carga

microbiana completamente ou garantir que estejam livres de contaminações em estágios posteriores, sendo sugerida a temperatura de 40 °C para a secagem das folhas de espinheira-santa de acordo com as análises realizadas.

A secagem conforme a rotina de um beneficiador ocorreu em temperaturas elevadas com prejuízo nos teores de substâncias ativas da planta.

Sugere-se que há necessidade de padronização do processo de secagem e controle das temperaturas na secagem de folhas de espinheira-santa, assim como para as demais plantas medicinais.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTON, M.D.; FALKENBERG, D.B.; FALKENBERG, M.B. Análise cromatográfica de fitoterápicos a base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, supl., v.12, p.11-13, 2002.
- ALBERTON, M.D. et al. Identificação de *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* para o controle de qualidade de espinheira-santa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, supl., v.12, p.9-11, 2002.
- ANDRADE, G.P.; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em pacientes assintomáticos. **Revista de Saúde Pública**, v.23, n.4, 1989.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo V, 2004.
- ARBOS, K.A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais de família Cruciferae de diferentes cultivos**. Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, jan/fev. 2006.
- BASTOS, C.T.R.M. et al. **Otimização do processo de secagem das folhas de *Inga edulis* para obtenção de extratos ricos em antioxidantes**. Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2006.
- BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57, p. 101-110, 2000.
- BHAT, T.K.; SHING, B.; SHARMA, O.P. Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation**, v.9, p.343-357, 1998.
- BIOCEN DO BRASIL. Microbiologia. Microorganismos. Disponível em <<http://www.biocendobrasil.com.br>> Acesso em 03 jan.2007
- BITTNER, S. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. **Amino Acids**, v.30, p.205-224, 2006.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, n. 181, p. 1199-2000, 1958.
- BOBBIO, P.A. ; BOBBIO F.O. Água. In : \_\_\_\_\_. **Química do Processamento de Alimentos**. 3.ed. São Paulo : Varela, 2001, p.1-12.

BORGES, D.B. et al. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.229-236, jul/set. 2005.

BORSATO, A.V. **Secagem da camomila sob diferentes temperaturas e vazões específicas do ar**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss.u.-Technol.**, v.28, p. 25-30, 1995.

BRITO, A.L.O. et al. **Principais cuidados no cultivo, manipulação e consumo de plantas medicinais. Erros e problemas mais comuns**. Trabalho da Disciplina de Farmacognosia I. Instituto de Farmácia. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 1999.

BUGNO, A. et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.41, n.4, 2005.

CAI, Y.Z. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n.25, p.2872-2888, 2006.

CHEN, Z.Y. et al. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.79, p.157-163, 1996.

CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, n.163, p. 1161-1168, 2002.

CIRIO, G.M. et al. Interrelação de parâmetros agronômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart.ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para a indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.4, n.2, p.67-76, Jul/Dez 2003.

CONFORTI, F. et al. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, n. 73, p. 479-483, 2002.

CORDEIRO, D.S.; OLIVEIRA, W.P. Drying of medicinal plants: equilibrium moisture content and mathematical modeling of *Maytenus ilicifolia* leaves. **Drying 2004**, São Paulo, v.C, p.1712-1719, 2004.

CORDEIRO, P.J.M.; VILEGAS, J.H.Y; LANÇAS, F.M. HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira-santa"). **J. Braz. Chem. Soc.**, v.10, n.6, p.523-526, 1999.

CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP. 1994. 162p.

COSTA, C.C.; CASALI, V.W.D.; MACEDO, J.A.B. Qualidade de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) após secagem e embalagem. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.1, n.2, p. 1-5, 1999.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2.ed. New York: New York Botanical Garden, 1988.

CRUZ, A.G.; CENCI, S.A.; MAIA, M.C.A. Good agricultural practices in a Brazilian produce plant. **Food Control**, v.17, p.781-788, 2006.

CUNICO, M.M. et al. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.69-73, jul/dez., 2002.

DECAGON DEVICES INC. **Aqualab Model CX2. Water Activity Meter. Operator's Manual Version 3.0**. Washington, 2001. Catálogo.

\_\_\_\_\_. **Fundamentals of Water Activity**. Disponível em <<http://www.decagon.com/aqualab>> Acesso em 05 out. 2006.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class natural therapeutic drugs. **Life Sciencies**, v.65, n.4, p.337-353, 1999.

DITCHFIELD, C. **Estudos dos métodos para a medida da atividade de água**. São Paulo, 2000. 174 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo.

DUARTE, M.R.; DEBUR, M.C. Steam and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v.76, n.1, p.41-49, 2005.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação da atividade utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH<sup>•</sup>. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, p. , 2006.

ENGLER, H.G.A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1964. 666p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988. 4 ed. São Paulo: Atheneu, v.2.20

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2000. 4 ed. São Paulo: Atheneu, v.4.2.3

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2002. 4 ed. São Paulo: Atheneu, mon. 176.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2003. 4 ed. São Paulo: Atheneu, fasc.4, mon. 194



FERREIRA, P.M. et al. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta**, v.219, p.319-324, 2004.

FLORES, R. et al. Regeneração in vitro de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Rev. Bras. de Agrociências**, v.4, n.3, p. 201-205, set/dez, 1998.

FONTE, N.N. A Complexidade das Plantas Medicinais: Enfoque Farmacêutico. In: \_\_\_\_\_. **Complexo Agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas, e condimentares no Estado do Paraná: diagnósticos e perspectivas**. Curitiba: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais: EMATER-Paraná: Embrapa Florestas, 2004. p. 24-45.

GARCIA, D.C. et al. A secagem de sementes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.603-608, 2004.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drug: Possible Modes of Action. **J. Nat. Prod.** V. 59, p. 205-215, 1996.

HAGERMAN, A.E. Tannin Chemistry. 2002. Disponível em <<http://www.muohio.edu/hagermae>> Acesso em: 02 out. 2006.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, n.9, p.1591-1598, 1992.

HIRATA, L.L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpinaceae, em serum**. Curitiba, 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

HNATYSZYN, O. et al. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the *corpus cavernosum* of Guinea pig. **Phytomedicine**, v.10, p.669-674, 2003.

HORNOK, L. Primary Processing of Medicinal Plants. In: \_\_\_\_\_. **Cultivation and processing of medicinal plants**. Chichester: John Wiley & Sons, 1992. p.86-93.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

ITOKAWA, H. et al. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v.30, n.11, p. 3713-3716, 1991. Abstract.

ITOKAWA, H. et al. Oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v.56, n.9, p.1479-1485, 1993.

JORGE, R.M. et al. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p. 93-100, set. 2004.

JESUZ, J.C. et al. **Automação do controle da temperatura do ar em secadores de plantas medicinais e aromáticas**. Trabalho apresentado no XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA, Foz do Iguaçu, 2001.

JULKUNEN-TIITTO, R.; SORSA, S. Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates. **Journal of Chemical Ecology**, v.27, n.4, p. 779-789, 2001.

JURD, L.; GEISSMAN, T.A. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v.21, n.12, p.1395-1401, 1956. Abstract

KHANBABAEE, K.; van REE, T. Tannins: Classification and Definition. **Nat. Prod. Rep.**, v.18, p.641-649, 2001.

KOEHLER, H. S. Manual simplificado de uso do programa MSTATC. Curitiba. UFPR/SCA Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, 38p, 1996.

LABORCHEMIKER. **Determinadora de Umidade. Manual do Usuário**. Curitiba. Catálogo.

LANÇAS, F.M. et al. Novas aplicações de sistemas SFE "Home made" I. Plantas medicinais brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.4, Campinas, 1997.

LEITE, J.P.V. et al. Isolation and Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.8, p. 3796- 3801, 2001.

LIMA, L.R. **Operações Unitárias. Secagem**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1971.

LIVI, C.P. **Fundamentos de Fenômenos de Transporte. Um texto para Cursos Básicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2004.

LU, Y.; FOO, L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, n.75, p.197-202, 2001.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York-Heidelberg-Berlin: Springer-Verlag, 1970. p.41-59, 119-131.

MADHAN, B. et al. Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v.37, n.1-2, p.47-53, 2005.

MAGALHÃES, P.M. **O Caminho Medicinal das plantas: aspectos sobre o cultivo**. Campinas: RZM, 1997. 120p.

\_\_\_\_\_. Agrotecnologia para o cultivo de espinheira-santa. 18 jan. 2002. Disponível em:

< <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm> > Acesso em: 02 out. 2005.

MARQUES, L.C. Entrevista a Revista eletrônica Comciência. Disponível em <<http://www.comciencia.br/reportagens/fito/fito8.htm>>. Acesso em: 15 set. 2005.

MARTINS, A.G.; GUTERRES, S.S.; ORTEGA, G.G. Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. **Acta Farm. Bonaerense**, v.22, n.1, p.39-44, 2003.

MARTINS, H.M. et al., Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.68, p.149-153, 2001.

MARTINS, P.M et al. **Secagem de capim-limão em camada delgada nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C com duas velocidades do ar de secagem: 0,5 e 1,0 m.s<sup>-1</sup>**. Trabalho apresentado no XXIX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2000, Fortaleza, 2000.

MELO, E.C.; RADÜNZ, L.L.; MELO; R.C. A. ; Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – Revisão. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v.12, n.4, p.307-315, out/dez. 2004.

MENG, X. et al. Formation and identifications of 4'-O-metil(-)-epigallocatechin in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v.29, n.6, p.789-793, 2001.

MOSSI, A.J. et al., Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO<sub>2</sub>. **Fitoterapia**, v. 75, n.2, p. 168-178, 2004.

MUJUMDAR, A.S. **Handbook of Industrial Drying**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1995.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, n.1, p.12-17, 2003.

NASCIMENTO, G.G.F. Microbiologia Geral. Roteiro de Aulas Práticas. Universidade Metodista de Piracicaba, 2003.

NEGRI, M.L.S. et al. **Influência das temperaturas de secagem da espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss nos teores de polifenóis**. Trabalho apresentado na V Jornada Catarinense de Plantas Medicinais e I Jornada Internacional de Plantas Medicinais, Joinville, 2006.

NEGRI, M.L.S., NAKASHIMA, T. Secagem da espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss e influência nos teores de polifenóis. In: XIV Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM, 2006. Unicamp, Campinas.

NOSSAK, A.C. et al. HPLC-UV and LC-MS Analysis of Quinonemethides Triterpenes in Hydroalcoholic Extracts of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* Martius, Celastraceae) leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.15, n.4, p.582-586, 2004.

OLIVEIRA, M.G.M. et al. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, n.1, p.29-41, 1991. Abstract.

PESSUTO, M.B. **Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante.** Maringá, 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá.

PETRY, R.D.; ORTEGA, G.G.; SILVA, W.B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex. **Pharmazie**, v.56, n.6, p.456-479, 2001. Abstract.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantification of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, n. 269, p.337-341, 1999.

QUEIROGA, C.L. et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 $\beta$ -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p. 465-468, 2000.

RADOMSKI, M.I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa – Paraná.** Curitiba, 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

RADÜNZ, L.L. et al. Efeitos da temperatura do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta *Lippia sidoides* Cham. **R. Bras. Armaz.**, v.27, n.2, p.9-13, 2002(a).

RADÜNZ, L.L. et al. **Secagem de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) em secador de bandejas.** Trabalho apresentado no XXXI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola- CONBEA 2002, Salvador, 2002(b).

RATTMANN, Y.D. et al. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, n.3, p.328-335, 2006.

REICHER, F., SIERAKOWSKI, M.R., CORRÊA, J.B.C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo fosfotúngstico-fosfomolibdico. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.24, n.4, p.407-411, 1981.

REIS, M.S.; SILVA, S.R. **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa**. Brasília: Ibama, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant Activity relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v.66, p.401-436, 1999.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v.1000, n.1-2, p.657-691, 2003.

ROCHA, L.O.; SOARES, M.M.S.R.; CORRÊA, C.L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.40, n.4, 2004.

SANNOMIYA, M. et al., A Flavonoid Glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p.237-239, 1998.

SANTOS, K.A. **Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hill.) em embalagens plásticas**. Curitiba, 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

SCHEFFER, M.C. Fisiologia pós-colheita de espécies medicinais, condimentares e aromáticas. In: WACHOWICZ, C.M.; CARVALHO, R.I.N. **Fisiologia vegetal: Produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002. p. 383-404.

SCHEFFER, M.C.; CORRÊA JUNIOR, C.; GRAÇA, L.R. Aspectos da Cadeia Produtiva da Espinheira-Santa. In: \_\_\_\_\_. **Complexo Agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas, e condimentares no Estado do Paraná: diagnósticos e perspectivas**. Curitiba: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais: EMATER-Paraná: Embrapa Florestas, 2004. p. 253-271.

SILVA, S.R. et al. **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Disponível em < [www.traffic\\_portu.pdf](#) > Acesso em: 16 jun. 2005.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2004.

SIRIWARDHANA, N. et al. Antioxidant Activity of *Hizikia fusiformis* on Reactive Oxygen Species Scavenging and Lipid Peroxidation Inhibition. **Food Sci. Tech. Int.**, v.9, n.5, p.339-346, 2003.

SMET, P.A.G.M. Overview of Herbal Quality Control. **Drug Information Journal**, v.33, p.717-724, 1999.

SOUZA-FORMIGONI et al. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n.1, p. 21-27, 1991. Abstract.

SOUSA, J.A.; MIRANDA, E.M. Cultivo e mercado de plantas medicinais – Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas. Disque-Tecnologia/CECAE/USP. Disponível em <[http://www2.ibama.gov.br/flora/plantas\\_medicinais.htm](http://www2.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm)> Acesso em: 15 set. 2005.

TIBERTI, L.A. et al. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, 2006.

VEDANA, M.I.S. et al. **Efeito do método de secagem na avaliação da capacidade antioxidante de tomate**. Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2006.

VELLOSA, J.C.R.; et al. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v.77, n.3, p. 243-244. abr. 2006.

XAVIER, H.S.; D'ANGELO, L.C.A. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1. jan/jun.1996.

YARIWAKE, J.H. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.162-168, abr/jun. 2005.

YOKOZAWA, T. et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemichal Pharmacology**, v.56, n.2, p.213-222, 1998.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998.

\_\_\_\_\_. **WHO guidelines on agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneva, 2003.

WILLELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, A.R.; CALIXTO, J.B. **PLANTAS MEDICINAIS sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 317-334.

ZARONI, M. et al. Qualidade microbiológica de plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n.1, p.29-39, 2004.

ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v.47, n.2, p.265-268, 1998.